UC-NRLF
$B 650 570

COLLEGE OF AGRICULTURE
DAVIS, CALIFORNIA

PROF. DR. L. MICHAELIS

PROF. L. MICHAELIS

Biochemische Zeitschrift.

Herausgegeben von

E. Buchner-Berlin, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Chr. Bohr-Kopenhagen, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Heidelberg, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Berlin, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, M. Jacoby-Heidelberg, R Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokyo, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-Berkeley, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, R. Pfeiffer-Königsberg, Ch. Porcher-Lyon, F. Rochmann-Breslau, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, Zd. H. Skraup-Wien, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, E. H. Starling-London, F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, A. Wohl-Danzig, J Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Zehnter Band.

Mit zwei Tafeln.

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1908.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
COLLEGE OF AGRICULTURE
DAVIS

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Ostwald, Wolfgang. Über die Lichtempfindlichkeit tierischer Oxydasen und über die Beziehungen dieser Eigenschaft zu den Erscheinungen des tierischen Phototropismus 1

Marchlewski, L. Studien in der Chlorophyllgruppe 131

Nerking, Joseph. Beiträge zur Kenntnis des Knochenmarkes 167

Bernstrop, J. C. Bemerkung zur Mitteilung der Herren M. Kumagawa und K. Suto über „Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierischem Material nebst der Kritik einiger gebräuchlichen Methoden“ 192

Nerking, Joseph. Die Verteilung des Lecithins im tierischen Organismus 193

Klempin, Paul. Studien über das amylolytische Ferment im Hafer . . 204

Levene, P. A. und **D. D. van Slyke.** Zur Methodik der Destillation der Aminosäurenester mittels der Geryk-Pumpe 214

Levene, P. A. und **John A. Mandel.** Über die Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren XIII 215

Levene, P. A. und **John A. Mandel.** Zur Chemie der Lebernucleoproteide 221

Jacoby, Martin. Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente VII . 229

Jacoby, Martin. Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente VIII 232

Orgler, Arnold. Bemerkungen zu den Arbeiten von Aron und Sebauer: „Untersuchungen über die Bedeutung der Kalksalze usw.“ und von Aron und Frese: „Die Verwertbarkeit verschiedener Formen des Nahrungskalkes usw.“ 236

Blumenthal, Ferd. und **Friedrich Herschmann.** Atoxyl- und Anilinvergiftung 240

Skraup, Zd. H. Über Desaminoproteine 245

Jensen-Hansen, H. Einige Bemerkungen über die Bangsche Methode der Zuckerbestimmung 249

Omi, Kaoru. Über das Verhalten des Salicins im normalen und diabetischen Organismus 258

Kusumoto, Chasaburo. Die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuren im Harn nach Einführung von Salicin in den Körpern des gesunden und des pankreaslosen Hundes 264

Battelli, F. und **Lina Stern.** Über das Vorkommen der Antikatalase im Tierorganismus 275

61861

Abderhalden, Emil. Zur Frage des Albumosegehaltes des Gesamtblutes, des Plasmas und des Serums 277
Michaelis, Leonor u. M. Ehrenreich. Die Adsorptionsanalyse der Fermente 283
Bauer, J. Über die bei der Wassermannschen Luesreaktion wirksamen Körper und über die hämolytischen Eigenschaften der Organextrakte 301
Butkewitsch, W. Zur Frage über die Umwandlung der Stärke in den Pflanzen und über den Nachweis der amylolytischen Enzyme . 314
Tsurusaki, H. Zur Kenntnis der komplexen Hämolysine 345
Ascoli, M. und **G. Izar.** Beeinflussung der Autolyse durch anorganische Kolloide. IV. 356
Traube, J. Über die Wirkung lipoidlöslicher Stoffe auf rote Blutkörperchen 371
Traube, J. Zur Komplementfrage 380
Traube, J. Zur Frage der Virulenz der Bakterien 387
Traube, J. und **Clara Goldenthal.** Das rote Blutkörperchen und sein Inhalt 390
Traube, J. Zur Spezifizitätsfrage 396
Tswett, M. Über das Phaeophytin und die Chlorophyllane nebst Schlußbemerkungen über das Phylloxanthin 404
Tswett, M. Über die Natur des sogenannten „krystallisierbaren Chlorophylls" (Metachlorophyllins) 414
Tswett, M. Das neue System der sogenannten Chlorophyllderivate . 426
Seligmann, E. Zur Kenntnis der Seruminaktivierung 430
Marchlewski, L. und **J. Retinger.** Zur Kenntnis des Hämopyrrols . . 437
Lebedew, Alexander. Auftreten von Formaldehyd bei der zellfreien Gärung 454
Benfey, Arnold. Über eiweißspaltende Enzyme im Säuglingsharn . . 458
Funaro, Roberto. Über die quantitative Bestimmung einiger reduzierender Substanzen im Säuglingsharn 463
Funaro, Roberto. Über den Kreatiningehalt des Säuglingsharns . . 467
Marchlewski, L. Studien in der Chlorophyllgruppe. II 472
Landolf, Fr. Ergebnisse neuerer Forschungen über Milchserum . . . 486
Pringsheim, Hans. Über die Unterdrückung der Fuselölbildung und die Mitwirkung von Bakterien an der Bildung höherer Alkohole bei der Gärung 490
Glikin, W. und **A. Loewy.** Zur Frage über den autolytischen und hydrolytischen Abbau des Eiweißes unter normalen und pathologischen Bedingungen 498

Über die Lichtempfindlichkeit tierischer Oxydasen und über die Beziehungen dieser Eigenschaft zu den Erscheinungen des tierischen Phototropismus.

Von

Wolfgang Ostwald.

(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 15. März 1908.)

Erste Abhandlung.

I. Allgemeines und Methodisches.

§ 1. Über die physikalisch-chemischen Prozesse, welche durch Absorption strahlender Energie in den Organismen hervorgerufen werden und welche die Grundlagen der phototropischen Reaktionen derselben bilden, besitzen wir zurzeit bekanntlich wenig mehr als ziemlich allgemeine Vermutungen. Dies gilt sowohl für die phototropischen Erscheinungen der Pflanzen, als auch für die der Tiere. Der einzige Versuch, der meines Wissens auf botanischem Gebiet gemacht worden ist, um auf experimentellem Wege Aufschluß über photochemische Veränderungen des Protoplasmas zu erlangen, welche eindeutig mit den phototropischen Reaktionen der Pflanzen verkoppelt sind, rührt von Czapek[1]) her. Dieser Autor fand, daß ganz allgemein beim Verlauf von Reizerscheinungen in der Pflanze (Geotropismus, Heliotropismus, Hydrotropismus usw.) eine Zunahme der auch in tierischen Geweben verbreiteten Homogentisinsäure stattfand. Diese Anhäufung der Homogentisinsäure kommt nach Czapek dadurch zustande, daß die Weiteroxydation derselben durch ein „antioxydatives" Ferment, welches

[1]) Czapek, Ber. d. botan. Ges. 20, 464, 1902 und 21, 229, 243, 1903.

der ebenfalls weit verbreiteten Tyrosinase entgegenwirkt, verhindert wird. Die betreffende Reizung würde also eine Vermehrung oder „Aktivierung" dieser Antioxydase zur Folge haben. Eine eingehendere, insbesondere auch quantitative Untersuchung dieser wichtigen Entdeckung steht noch aus. — Fernerhin hat J. Loeb[1]) die Vermutung ausgesprochen, daß auf der belichteten Seite eines positiv heliotropischen Pflanzenteils etwa Oxydationsprozesse, auf der unbelichteten Seite etwa Reduktionsprozesse in verstärktem Maße vor sich gehen.[2]) Eine direkte experimentelle Prüfung hat indessen auch diese Ansicht nicht erfahren.

Was die den phototropischen Reaktionen der Tiere zugrunde liegenden photochemischen Prozesse anbetrifft, so ist, soviel ich weiß, keinerlei experimentelles Material vorhanden, welches gestattet, uns über die Natur und die Bedingungen dieser Vorgänge eine irgendwie bestimmte Vorstellung zu machen. Von den Vermutungen, welcher Art diese Prozesse sein können, sind insbesondere die Ansichten von J. Loeb, dem Begründer des Begriffes der tierischen Tropismen, zu nennen. Während z. B. dieser Autor in seinen „Vorles. üb. d. Dynamik der Lebenserscheinungen" nur allgemein von Stoffen spricht, „deren Reaktion durch das Licht beschleunigt oder verzögert wird (188)", hat er in einer neuern Publikation, welche die experimentelle Beeinflussung phototropischer Erscheinungen durch chemische Faktoren sowie durch ultraviolettes Licht darlegte, die Möglichkeit erwogen, daß „die Erregung von positivem Heliotropismus bei Tieren durch Säuren auf der Hemmung der Bildung oder Wirksamkeit einer antipositiven Substanz (der Kürze halber sei dieser Ausdruck gestattet) beruht. Es wäre denkbar, daß die Bedingungen von positivem Heliotropismus — also die positiv heliotropische Substanz — in den uns hier interessierenden Organismen[3]) gegeben sind, daß aber deren (photochemische?)

[1]) J. Loeb, Vorles. üb. d. Dynamik d. Lebenserscheinungen, Leipzig, 1906, 171, 172.

[2]) Siehe die ausführlichen Erörterungen weiterer möglicher Wirkungen des Lichts bei phototropischen Reaktionen der Pflanzen in Pfeffer, Pflanzenphysiologie, II. Aufl., 2, § 112, 113, 125, 126 und speziell § 127, 645 ff.

[3]) Gemeint sind die unter natürlichen Bedingungen negativ heliotropischen Daphnien, Volvox usw.

Wirksamkeit durch die fortwährende Bildung gewisser Stoffe im Tierkörper resp. in den Augen gehemmt wird. Nehmen wir nun an, daß Säure die Bildung dieser letzten Antikörper hemmt, so ist die positivierende Wirkung der Säure verständlich. Ebenso ist alsdann die positivierende Wirkung der Temperaturerniedrigung verständlich, da ja hierdurch die Geschwindigkeit der Bildung der hemmenden Antikörper verringert wird." „Was nun die Erregung von negativem Heliotropismus durch ultraviolette oder violette Strahlen betrifft, so kann es sich hier sowohl um die Bildung einer negativ heliotropischen Substanz auf photochemischem Wege als auch, bei etwaigem Vorhandensein einer solchen, um Zerstörung der antagonistischen positiven Substanz oder um beides handeln. Da Temperaturerniedrigung diesen Vorgang verzögert, so sind beide Möglichkeiten in Betracht zu ziehen."[1]) Wie man sieht, hat diese theoretische Anschauung eine gewisse Ähnlichkeit mit den Ansichten Czapeks, nach denen die phototropische Reizung bei Pflanzen ebenfalls die vermehrte Bildung einer „Antioxydase" veranlassen soll. Allerdings sind die Loebschen Vermutungen allgemeinerer und entsprechend unbestimmterer Natur als die Anschauungen von Czapek, für welche doch einige nähere, wenn auch noch wenige experimentelle Unterlagen vorhanden sind. Eine andere Möglichkeit, welche besagt, „daß die Säuren bei den Süßwasserorganismen dadurch positiven Heliotropismus hervorrufen, daß sie die Bildung einer gewissen Substanz beschleunigen, von welcher dieser positive Heliotropismus abhängt" (l. c. 577), hält J. Loeb für ausgeschlossen. Als Beweis hierfür sieht J. Loeb den Umstand an, daß bei höherer Temperatur nicht weniger, sondern mehr Säure als bei niedriger Temperatur nötig ist, um eine positivierende Wirkung hervorzurufen, eine Tatsache, die den geläufigen Ansichten über den Temperatureinfluß die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen (in unserm Falle die Bildung der positivierenden Substanz) widerspricht. — Ich habe diese Ansichten darum so ausführlich wiedergegeben, weil sie in der Tat die einzigen Vermutungen sind, welche bisher über die Natur der photochemischen Vorgänge, die den photo-

[1]) J. Loeb, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., 115, 578, 1906.

tropischen Reaktionen der Tiere zugrunde liegen, angestellt worden sind.

§ 2. Während gewisser noch nicht veröffentlichter und auch noch nicht abgeschlossener Versuche über den Einfluß ausgesprochener organischer und anorganischer Oxydations- und Reduktionsmittel, sowie einiger optischer Sensibilisatoren auf die phototropischen Reaktionen von Daphnia kam mir der Gedanke an eine weitere theoretische Möglichkeit der photochemischen Wirkungsweise strahlender Energie auf Organismen. Diese Möglichkeit erschien insbesondere darum der Prüfung wert, weil sie bestimmtere photochemische Prozesse, die einem experimentellen Studium nicht unzugänglich erschienen, in Betrachtung zog. Die bezeichneten Versuche legten nämlich die Frage nahe, ob nicht vielleicht ein Zusammenhang der phototropischen Erscheinungen mit den Atmungs- oder Oxydationsvorgängen im allgemeinen Sinne, d. h. mit der Gewebeatmung, im Gegensatz z. B. zu den speziellen Oxydationsvorgängen gewisser Nahrungsbestandteile usw., besteht. Schon von allgemein biologischen Gesichtspunkten aus erscheint ein solcher Zusammenhang darum nicht unmöglich, weil man aus der ungeheuren Verbreitung der phototropischen Reaktionsfähigkeit schließen kann, daß die photochemisch beeinflußbaren Vorgänge, welche die orientierten Bewegungsreaktionen veranlassen, ebenfalls zu einer sehr allgemeinen und weit verbreiteten Klasse von Prozessen in tierischen sowohl wie in pflanzlichen Organismen gehören müssen. Auf der andern Seite ist es ja wahrscheinlich, daß es kaum eine chemische Reaktion gibt, welche nicht bis zu einem gewissen Grade lichtempfindlich ist (siehe z. B. Wilh. Ostwald, Lehrb. d. allgem. Chem., 2. Aufl., II, 2, 1012). Zu den allgemeinsten derartigen für fast alle Organismen charakteristischen Prozessen gehören aber zweifellos die allgemeinen Oxydationsvorgänge. Ferner weisen auch speziellere biologische Tatsachen bereits auf einen Zusammenhang zwischen Gewebeatmung und Phototropismus hin. So sei an die von Loeb gefundene Tatsache erinnert, daß Blattläuse, Ameisen usw. einen ausgesprochenen positiven Phototropismus nur zur Zeit ihrer geschlechtlichen Reife resp. zur Zeit ihres „Hochzeitsfluges" usw. zeigen. Man wird nicht fehl gehen, wenn man die an höheren Tieren, z. B.

Amphibien, zur Brunstperiode gefundene beträchtliche Steigerung der allgemeinen Atmungstätigkeit auch bei niederen Tieren unter analogen Umständen annimmt, obgleich mir spezielle Untersuchungen hierüber nicht bekannt sind, und auch bei den eben ausgeschlüpften jungen Räupchen, z. B. von Porthesia chrysorrhoea, welche einen so außerordentlich intensiven positiven Phototropismus zeigen, wird voraussichtlich eine entsprechende Erfahrung gemacht werden.[1]) Natürlich folgt aus der Gleichzeitigkeit von intensiver Atmung und ausgeprägtem Phototropismus noch nicht, daß zwischen ihnen ein kausaler Zusammenhang besteht; indessen machen die angegebenen Parallelen eine solche Möglichkeit doch zu einem gewissen Grade wahrscheinlich.

Es ergeben sich nun insbesondere zweierlei Wege, diese Vermutung experimentell zu prüfen, Der erste besteht darin, daß man, kurz gesagt, die respiratorischen Koeffizienten phototropischer Tiere unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht. Man sollte erwarten, daß sich, falls ein derartiger Zusammenhang besteht, Verschiedenheiten in den Werten dieser Koeffizienten im Licht und im Dunkeln, sowie entsprechend des positiven oder negativen Sinnes des Phototropismus des betreffenden Organismus usw. ergeben würden. Man wäre auf diesem Wege imstande, den „Brutto"-Einfluß des Lichtes auf die Atmungsvorgänge der phototropischen Organismen zu untersuchen. Allein es ist nicht unmöglich, daß diese Methode zu wenig empfindlich ist, um derartige Einflüsse mit größerer Deutlichkeit zu zeigen, und in diesem Sinne scheinen auch z. B. die Versuche der Botaniker über den Lichteinfluß auf die Atmung der Pflanzen ausgefallen zu sein, insofern, als nach Pfeffer[2]) kaum eine derartige Abhängigkeit nachgewiesen werden konnte. Weiterhin würde aber auch eine Abhängigkeit des respiratorischen Koeffizienten von der Belichtung nichts über die photochemischen Vorgänge, welche die Veränderung

[1]) Siehe z. B. das entsprechende Verhalten auch der Blattknospen, bei welchen während und nach ihrer Entfaltung die Atmungstätigkeit im Vergleich zu den ausgewachsenen Blättern ihren Höhepunkt erreicht (Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., 1, 529).

[2]) Pfeffer: Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., 1, 573; Czapek, Biochemie d. Pflanz. 2, 399 ff., 1906.

der Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabscheidung bei Belichtung verursachen, und welche uns hier besonders interessieren, aussagen, und endlich können ja auch oxydative, photochemisch empfindliche Vorgänge im Organismus sich abspielen, welche zu Umlagerungen des Sauerstoffs innerhalb des Organismus führen, und welche durch den respiratorischen Koeffizienten nicht zum Ausdruck gebracht werden können, resp. ihn nicht oder nur unwesentlich beeinflussen. Alle diese Umstände machen den Wert dieser allgemeinen Methode etwas fraglich.

Der zweite Weg, um etwaige Beziehungen zwischen den Oxydationsvorgängen im Organismus und Lichtwirkungen aufzufinden, ist folgender: Bekanntlich führt der Organismus eine ganze Reihe von Oxydationen aus, welche im Reagensglas nicht oder nur durch Zufuhr beträchtlicher Mengen nichtchemischer Energie (Wärme, elektrische Energie usw.) oder aber auf chemischen Wegen, welche der Organismus sicher nicht einschlägt, da dieselben bei seiner Zusammensetzung nicht möglich sind, vor sich gehen. Die neueren Forschungen haben nun bekanntlich mit großer Allgemeinheit ergeben, daß die physikalisch-chemischen Mittel, welche der Organismus besitzt, um ganz allgemein derartige im Reagensglas mit entsprechenden Ausgangsstoffen nicht stattfindende Reaktionen zu ermöglichen, in Katalysatoren resp. Fermenten bestehen. Auch für die oxydativen Vorgänge im Organismus hat sich in neuerer Zeit mehr und mehr gezeigt, daß auch hier ungemein weit verbreitete Fermente existieren, welche die bei biologischen Temperaturen sonst unmöglichen Vorgänge der Gewebeoxydation veranlassen oder ermöglichen, resp., um mit Pfeffer zu reden, den molekularen Luftsauerstoff derart „in das Stoffwechselgetriebe reißen", daß diese physiologischen Verbrennungen stattfinden. So zwingend auf der einen Seite alle neueren Untersuchungen auf die wichtige Rolle dieser oxydativen Fermente bei den physiologischen Verbrennungsprozessen hinweisen[1]), so wenig

[1]) Siehe die übersichtliche Darstellung in J. Loeb, Vorles. usw. 30 ff.; ferner Czapek: Biochemie d. Pflanzen 2, 464 ff.; Oppenheimer, Fermente, 2. Aufl. 1903, 13, 18, 48, 186 usw.; Schade, Medizinisch-katalytische Studien, Kiel 1907, 25, 346 usw.; Engler und Weissberg, Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation, Braunschweig 1904, 144, 180, insbesondere 186 ff.

sicher sind wir andererseits über die nähere chemische Dynamik dieser oxydativen Fermentwirkungen. Ich beabsichtige nicht, an dieser Stelle eine ausführliche Übersicht über die verschiedenen Ansichten über die näheren Wirkungsweisen oxydativer Fermente zu geben, sondern möchte nur kurz den folgenden Punkt hervorheben, wobei ich außerdem auf eine frühere Abhandlung, in welcher derselbe Gegenstand bereits etwas ausführlicher behandelt wurde[1]), hinweisen möchte. Das Sicherste vielleicht, was wir den mannigfaltigen experimentellen Erfahrungen zurzeit entnehmen können, ist die Existenz wenigstens zweier, in gewissem Sinne entgegengesetzt wirkender Fermente oder Stoffe in den Extrakten der Gewebe und Körperflüssigkeiten der Organismen. Dies sind auf der einen Seite die als „echte" Oxydasen bekannten Peroxydasen (Ozonide, echte und indirekte Oxydasen, Bourquelot; α-, β- und γ-Oxydasen von Grüß, Oxygenasen und Peroxydasen, Bach und Chodat usw.), auf der andern Seite das Enzym, welches mit einer Ausnahme[2]) bisher nur betreffs seiner Wirkung auf Wasserstoffsuperoxyd untersucht wurde, die Katalase (Loew, Hämase Senter usw.). Ich möchte das, was ich zur allgemeinen Charakteristik dieser zwei bis drei Arten von Fermenten resp. Stoffen in meiner zitierten Abhandlung gesagt habe, hier nicht wiederholen und auch nicht auf jene dort näher bezeichnete Modifikation der fermentativen Atmungstheorien von J. Loeb, Bach und Chodat, Loew, Senter usw., welche mir den experimentellen Tatsachen am angemessensten erscheint, eingehen; einige speziellere Punkte werden weiter unten nochmals erörtert werden. Nur einen dort nicht besprochenen Umstand von besonderer Wichtigkeit möchte ich hier berühren.

Von Pfeffer ist mehrfach nachdrücklich darauf hingewiesen worden[3]), daß man nicht ohne weiteres berechtigt ist, aus den Eigenschaften von Extrakten der toten Gewebe und Körperflüssigkeiten Schlüsse auf die entsprechenden Verhält-

---

[1]) Wo. Ostwald: Biochem. Zeitschr. 6, 409, 1907.

[2]) Über die Rolle der Katalase bei der Reduktion des Oxyhämoglobins: Walter Ewald, Archiv f. d. ges. Physiol. 116, 334, 1907.

[3]) Siehe z. B. Pflanzenphysiologie, 2. Aufl. 1, 553, 554, sowie Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen, Abh. d. k. sächs. Akad. d. Wissensch. 1889.

nisse im lebenden Organismus zu ziehen. So richtig diese Warnung zweifellos ist, so glaube ich doch nicht, daß die Schlußfolgerungen, welche man aus den Eigenschaften sog. „toter" Organismenteile usw. in bezug auf die Eigenschaften normaler oder lebender Organismen zieht, ganz ohne alle Bedeutung sind. Zunächst ist ja schon der Begriff „tot" ein sehr variabler und ein für verschiedene Organe usw. sehr Verschiedenes bedeutender Begriff. Man könnte z. B. im Zweifel sein, ob man das zur Transfusion durch eine Glasröhrenleitung usw. geleitete Blut eines Wirbeltieres als lebend oder tot bezeichnen muß, resp. ob man aus dem Verhalten des aus dem Körper entfernten frischen Blutes Schlüsse auf das Verhalten desselben im Tierkörper ziehen darf. Wären derartige Schlußfolgerungen aus Eigenschaften „toter", von Organismen abstammender Systeme nicht wenigstens zum Teil berechtigt, d. h. kausal erfolgreich, so würde ja eine analytische Biochemie, welche doch in den weitaus meisten Fällen den Organismus zersetzen, ihn schädigen oder doch (bei Versuchen in vivo) unter nicht normale Bedingungen bringen muß, ganz unmöglich oder zwecklos, was aber nach ihren bisherigen Erfolgen gewiß nicht der Fall ist. In ganz entsprechender Weise muß sich ja auch die Anatomie und Histologie zum größten Teile mit dem Studium „toter" Organismen begnügen, und obschon z. B. die histologischen Befunde auch nur mit Vorsicht zu Schlüssen auf die Struktur der lebenden Substanz anwendbar sind (man denke dabei z. B. an die Rolle der Fixierungsmittel usw., A. Fischer, G. Mann u. a.), so wird man ihnen doch nicht allen Wert absprechen können. Selbstverständlich bin ich auch der Ansicht von Pfeffer, daß derartige Versuche mit „toten", besser vielleicht mit „isolierten" Organteilen, — extrakten usw. zunächst nur Annäherungen an die wirklichen Verhältnisse im normalen „lebenden" Organismus darstellen, indessen sehe ich nur diesen Weg der sukzessiven analytischen Annäherung, um in das Verständnis der komplizierten Gesamterscheinungen einzudringen. Daß mittels dieser Methoden angestellte Untersuchungen zu wichtigen Aufklärungen biologischer Probleme führen können, zeigen u. a. die Untersuchungen von Buchner und seinen Mitarbeitern über den „Preßsaft" der Hefezellen. —

Im Sinne dieser Ausführungen habe ich nun versucht, einen etwaigen Zusammenhang der Atmungs- oder allgemeinen Oxydationsvorgänge in tierischen Organismen mit den phototropischen Eigenschaften der letzteren dadurch zu untersuchen, daß ich die Einwirkungen des Lichts auf die Fermente oder Stoffe, welche bei den Oxydationsvorgängen im Tierkörper sicher oder mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle spielen, an Extrakten dieser Fermente aus den Geweben und Köperflüssigkeiten derselben studiert habe.

§ 3. Bevor ich zur Schilderung der Versuche selbst sowie der bei ihnen befolgten Methoden übergehe, wird es zweckmäßig sein, kurz die Resultate zu berühren, welche bisher bezüglich der Wirkungen des Lichts auf Fermente ganz im allgemeinen gewonnen worden sind[1]). Man hat bei den Lichtwirkungen auf Fermente insbesondere zwei Gruppen von Reaktionen zu unterscheiden, welche in der Literatur nicht immer scharf auseinander gehalten werden. Die eine Gruppe enthält die Wirkungen des Lichts auf die Entstehung oder Bildung der Oxydasen in pflanzlichen und tierischen Geweben, ferner aber auch in den Preßsäften oder Organextrakten desselben. Zur andern Gruppe gehören die Einflüsse strahlender Energie auf die fermentativen Oxydationsprozesse selbst, sowohl der in den Geweben des lebenden Organismus als auch der mit den Extrakten im Reagensglas stattfindenden. Es ist anzunehmen, daß im lebenden Organismus beide Prozesse nebeneinander verlaufen, und daß namentlich für den Fall, daß die Peroxydase, resp. das sie begleitende, für ihre Wirksamkeit notwendige organische Peroxyd während der Reaktion verbraucht wird, eine fortwährende Neubildung desselben stattfindet.

Über Wirkungen des Lichtes speziell auf oxydative

---

[1]) In bezug auf die Literatur der photobiologischen Wirkungen insbesondere auf tierische Organismen überhaupt sei auf die Arbeiten von Busck, Mitt. Finsens Lichtinst., Heft VIII, 1904, sowie Biochem. Zeitschr. 1, 425 ff., 1906, hingewiesen. Die photobiologische Literatur über Pflanzen findet sich bis auf die Arbeiten der letzten Jahre vollständig berücksichtigt in Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., 1897 bis 1904; die neuere Literatur ist in Czapek, Biochemie d. Pflanzen 1 u. 2, 1905—1906, aufgezählt.

Fermente habe ich in der Literatur keine Angaben finden können. Ich sehe dabei ab von der allgemeinen Feststellung, welche öfters in der Literatur zu finden ist, daß Fermente allgemein von direktem Sonnenlicht bei Sauerstoffzutritt geschädigt werden, sowie von den schon oben berührten Untersuchungen über den Einfluß der Belichtung auf den Gesamtprozeß der pflanzlichen Atmung. Es wird sich später zeigen, daß diese allgemeine Feststellung des schädigenden Einflusses des Sonnenlichtes auf Fermente bei Sauerstoffzutritt nicht zutrifft in bezug auf das eine der oxydativen Fermente, die Peroxydase. Dagegen ist für andere z. B. hydrolytische Fermente ein spezieller Lichteinfluß wohl beobachtet und studiert worden[1]). Insbesondere durch Green[2]) wurde gezeigt, daß die Wirkung der Diastase des Speichels durch Licht sowohl verstärkt als vermindert werden kann. Es ergab sich bei diesen Untersuchungen u. a. ein interessanter Einfluß der Wellenlänge, insofern als rote und gelbe Strahlen die Wirkung begünstigten, violette sie im Vergleich zu im Dunkeln vor sich gehenden Reaktionen hemmten. Es handelt sich bei diesen Versuchen von Green um Lichteinflüsse der ersten Gruppe, d. h. um eine Neubildung und Zerstörung oder vorhergehende „Aktivierung" und „Inaktivierung" der Diastase durch Licht, da Green nicht den Einfluß des Lichtes auf die Spaltung selbst untersuchte, sondern eine Vermehrung oder Verminderung der diastatischen Wirksamkeit nach der Belichtung der Speichelflüssigkeit maß. Ähnliche Versuche über die im allgemeinen zerstörende Wirkung des Lichtes auf Fermente oder Fermentlösungen selbst sind ferner von Downes und Blunt[3]), Fermi und Pernossi[4]), Duclaux[5]), Fernbach[6]), Emmer-

---

[1]) Siehe die Literatur über das folgende in Czapek, l. c. 1, 71; Duclaux, Traité de Microbiologie 2, 221 ff.; Oppenheimer, Fermente, 2. Aufl., 37, 1903. Über Lichtwirkungen auf Fermente im allgemeinen hat sich Duclaux wohl am ausführlichsten geäußert.

[2]) Green, J. R. Phil. Trans. Roy. Soc. London. 188, 167 ff., 1897,

[3]) Downes und Blunt, Proc. Roy. Soc. Lond. 26, 1877 und 28, 1878.

[4]) Fermi und Pernossi, Zeitschr. f. Hygiene 18, 83, 1894.

[5]) Duclaux, loc. cit. 2, 222, 1899.

[6]) Fernbach, Ann. de l'Institut Pasteur. 3, 473, 1889.

ling[1]), Schmidt-Nielsen[2]) usw. angestellt worden. Das wichtigste, allen diesen Untersuchungen gemeinsame Resultat scheint der Umstand zu sein, daß der Sauerstoff eine wichtige, wenn nicht ausschlaggebende Rolle bei dieser Zerstörung spielt. Dies wird unter anderem gezeigt durch vergleichende Versuche mit offenen und geschlossenen, flachen und hohen Gefäßen, aus Experimenten in Wasserstoff- und Sauerstoffatmosphäre, und vielleicht besonders deutlich durch die schon von Fernbach aufgefundenen, späterhin von Tappeiner und seinen Mitarbeitern bestätigten Einfluß geringer Mengen von Säure oder Alkali, insofern als schon kleine Zusätze von Säure die Zerstörung der Fermente beschleunigten, eine alkalische Reaktion die Fermente verglichen mit neutralen Lösungen jedoch ein wenig schützte. Weiterhin ist an dieser Stelle die eben erschienene Arbeit von Dreyer und Hanssen[3]) zu nennen, in der der wichtige Nachweis gelungen ist, daß die Zerstörung belichteter Fermente, Toxine usw. sehr genau gemäß einer monomolekularen Reaktionsformel vor sich geht, ein weiterer Beweis für die chemische Natur der Lichtwirkung.

Zu den Lichtwirkungen der zweiten Gruppe haben insbesondere die „photodynamischen" Untersuchungen von Tappeiner, Jodlbauer und ihren Schülern Busck, Stark, Liebel, Tillmetz, Rehm, Riegner, Quiring, Locher usw. interessante Beiträge geliefert[4]). Aus diesen Untersuchungen geht einerseits hervor, daß der Zusatz schon von äußerst geringen Mengen fluorescierender Substanzen, z. B. die Invertierung von Zucker durch Invertin bei Belichtung stark behindert, resp. das Ferment zerstört, während ohne Acridin-, Eosin- usw. Zusätze die Hemmung der Reaktion bei gleicher Belichtungsdauer eine verhältnismäßig geringe ist. Auf der anderen Seite

---

[1]) Emmerling, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 34, 3811, 1901.

[2]) Schmidt-Nielsen, Mitt. Finsens Lichtinst. 9, 1904.

[3]) Dreyer und Hanssen, Compt. rend. 145, 564, 1907.

[4]) Die Literatur über diese Untersuchungen ist vollständig von Busck in Biochem. Zeitschr. 1, 435ff., 1906, gesammelt worden. Die wichtigsten speziell sich auf Enzyme beziehenden Arbeiten sind: H. von Tappeiner, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 36, 3035, 1903; v. Tappeiner und Jodlbauer, D. Arch. f. klin. Med. 80, 427, 1904; ibidem 85, 1906.

aber wurde gefunden, daß auch hier der Sauerstoff eine sehr wichtige Rolle spielt insofern, als die Schädigung nur in Sauerstoffatmosphäre stattfand, sowie der große Einfluß saurer Reaktionen nachgewiesen wurde. Interessant ist noch fernerhin, daß von Straub[1]) sowie von Jodlbauer und Tappeiner selbst in vielen Fällen bei Belichtung der Lösungen fluorescierender Stoffe die Bildung „aktiven" Sauerstoffes, d. h. das Auftreten peroxydartiger Verbindungen nachgewiesen werden konnte.

§ 4. Abgesehen nun von dem Einfluß des Lichts auf die Bildung und Wirkung oxydativer Fermente, möchte ich die Tatsache hervorheben, daß ganz allgemein Oxydationsprozesse, welche photochemisch beeinflußbar sind oder überhaupt nur bei Lichtzutritt mit merklicher Geschwindigkeit verlaufen, außerhalb des Organismus überaus häufig sind, namentlich aber bei Reaktionen organischer Körper vorkommen.[2]) Von den mannigfachen Beziehungen zwischen diesen nicht physiologischen Oxydationen und den fermentativen Atmungsvorgängen möchte ich hier nur die zwei folgenden besonders interessanten hervorheben.

Es ist durch neuere Arbeiten mehrfach gezeigt worden, daß gerade für Oxydationen organischer Körper, welche sich in bezug auf ihre Reaktionsgeschwindigkeit vom Lichte abhängig erwiesen haben, das Auftreten resp. die Mitwirkung von sauerstoffreichen, oft ziemlich labilen Verbindungen (Peroxyden, Moloxyden usw.) charakteristisch ist. In manchen Fällen sind derartige Peroxyde (einschließlich Wasserstoffsuperoxyd) isoliert worden, und es hat sich weiterhin gezeigt, daß diese Peroxyde die Oxydation des betreffenden Körpers ungemein beschleunigen, sowie durch Belichtung vermehrt werden. Infolge dieser photochemischen Vermehrung der die Oxydation beschleunigenden oder vielleicht erst ermöglichenden Peroxyde hat eine Oxydation vieler organischer Körper im Lichte die Form einer Autoxydation resp. genauer den Reaktionscharakter einer Autokatalyse. Dies ist z. B. besonders ausführlich von A. Genthe[3])

---

[1]) Straub, Münch. med. Wochenschr. 1904, Nr. 25, sowie Arch. f. experim. Patholog. 51, 383, 1905.

[2]) Siehe Eder, Photochemie 3. Aufl. Kap. 23, 24, 25 usw., ferner besonders 21, 61, 111, 112, 349 usw.; weiterhin Engler und Weißberg, Vorgänge der Autoxydation, Braunschweig 1904, 178 usw.

[3]) A. Genthe, Zeitschr. f. angew. Chem. 1906.

für die Oxydation des Leinöls gezeigt worden; zweifellos verlaufen auch viele andere lichtempfindliche Oxydationsvorgänge namentlich organischer Körper nach diesem Schema. Nun sind aber bekanntlich schon seit Schönbeins Entdeckung der guajakbläuenden Eigenschaft pflanzlicher Säfte, namentlich aber durch die neueren Arbeiten von Bach und Chodat,[1]) Engler und Wöhler[2]) Kastle und Loevenhart[3]) usw. enge Beziehungen zwischen oxydierenden Fermenten und organischen Peroxyden vermutet und zum Teil auch gefunden worden, so daß z. B. die vier zuletzt genannten Forscher die Existenz eines typischen oxydativen Ferments in Frage stellen und an Stelle dieses ein labiles organisches Peroxyd selbst setzen. In der Tat sind ihre diesbezüglichen Versuche mit typischen isolierbaren organischen Peroxyden (z. B. Benzoyl-, Phtaylsuperoxyd usw.) ziemlich überzeugend, und ich möchte gleich hier bemerken, daß meine Versuche über den Einfluß der Belichtung auf „peroxydasen"-haltige Extrakte ebenfalls in diesem Sinne sprechen, insofern als im allgemeinen Belichtung hier gleichfalls eine Vermehrung oder Aktivierung der guajakbläuenden Eigenschaft derselben verursacht. Dieses Verhalten bringt das betreffende fragliche Ferment in Gegensatz zu den photochemischen Eigenschaften aller übrigen bisher untersuchten Fermente, wenigstens soweit was die Lichtempfindlichkeit der oxydativen Reaktionen selbst anbetrifft. Schließlich spricht noch folgender Grund für die peroxydartige Charakteristik des betreffenden Katalysators. Ich hatte gefunden, daß der Zusatz von KCN selbst in relativ großen Konzentrationen die Tätigkeit einer in den Geschlechtszellenextrakten von Amphibien enthaltenen Peroxydase nicht wesentlich zu hindern vermag.[4]) Unabhängig und gleichzeitig hat nun Bach dasselbe Verhalten für eine pflanzliche Oxydase festgestellt.[5]) Bach kommt zu

---

[1]) Bach und Chodat, Siehe das Sammelreferat derselben im Biochem. Zentralbl. 1, 417 u. 457, 1903, in welchem ihre Einzeluntersuchungen sowie die früheren anderer Forscher angegeben sind. Bezüglich neuerer Literatur vgl. Wo. Ostwald, Biochem. Zeitschr. 6, 409, 1907.

[2]) Engler und Wöhler, Zeitschr. f. anorgan. Chem. 29, 1ff., 1902.

[3]) Kastle und Loevenhart. Amer. J. Chem. Soc. 26, 539ff., 1903.

[4]) Wo. Ostwald, Biochem. Zeitschr. 6, 409, 1907.

[5]) Bach, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 3185, 1907.

dem Schluß, daß es sich bei der Wirkung von Cyan auf die Peroxyde nicht um eine eigentliche Giftwirkung, d. h. um eine Hemmung in relativ kleinen Konzentrationen handelt, entsprechend dem bekannten Einflusse desselben auf andere Fermente, sondern daß die „Peroxydase" mit dem Cyan eine Verbindung nach stoechiometrischen Verhältnissen eingeht und dadurch ihre oxydative Wirksamkeit einbüßt. Auch dieser Umstand spricht für die peroxydähnliche Natur des Ferments resp. zum wenigsten für den engen Zusammenhang eines echten oxydativen Ferments mit derartigen labilen bei Belichtung sich vermehrenden sauerstoffreichen Verbindungen.

Eine zweite Gruppe interessanter Beziehungen zwischen den Lichtwirkungen auf Fermente und photochemischen, nichtphysiologischen, speziell auch oxydativen Reaktion bezieht sich auf den Einfluß der Wellenlänge des Lichts. Wie schon oben erwähnt, fand Green, daß das Licht je nach seiner Wellenlänge die Diastase des Speichels sowohl vermehren (aktivieren) als auch vermindern (zerstören) konnte. Diese entgegengesetzte Wirkung von Licht verschiedener Wellenlänge ist nun besonders darum interessant, weil auch andere chemische Reaktionen, speziell auch Oxydationen, welche nicht im Organismus vor sich gehen, in derselben Weise beeinflußt werden. So färbt sich Papier, das mit alkoholischer Guajaklösung getränkt ist, im weißen und violetten Licht unter Oxydation grün bis blau, im roten Licht unter Reduktion wieder gelb (Wollaston, Herschel, Becquerel).[1]) Ferner sind in diesem Zusammenhang besonders wichtig die Untersuchungen von Trautz und Thomas,[2]) aus denen hervorgeht, daß eine ganze Anzahl verschiedenartiger Reaktionen (Oxydation von Pyrogallol, Benzaldehyd, Zerfall von H_2O_2, Zersetzung von Kupferchlorür, Na_2S usw.) durch Bestrahlung mit Licht verschiedener Wellenlänge insofern entgegengesetzt werden, als verschiedenfarbiges Licht die Reaktionen im Verhältnis zur Dunkelreaktion sowohl beschleunigen als auch hemmen kann. Wie weiter unten gezeigt werden wird, gilt Ähnliches auch für die Lichtwirkung auf peroxydasehaltige tierische Extrakte.

---

[1]) Siehe z. B. Eder, Photochemie 3. Aufl. 1906, 371; auch Wilh. Ostwald, Lehrb. d. allgem. Chem. 2. Aufl. 2, 1, 1085.

[2]) Trautz und Thomas, Physikal. Zeitschr. 7, 899, 1906.

§ 5. Es erübrigt noch die bei der Untersuchung angewandten Methoden kurz zu schildern, wobei ich indessen betreffs ausführlicher Angaben auf meine zitierte Abhandlung über das Vorkommen oxydativer Fermente in Geschlechtszellenextrakten, in welcher fast dieselben Versuchsanordnungen benutzt wurden, verweisen möchte.

Zunächst möchte ich angeben, daß ich beiderlei Fermente, die guajakbläuende Peroxydase, sowie die wasserstoffperoxydzersetzende Katalase, in den Extrakten fast aller von mir bisher untersuchten heliotropischen Tiere gefunden habe, wennschon in stark wechselnden Mengen. Namentlich variierte die Menge der Peroxydase je nach der Spezies und je nach den Lebensbedingungen der untersuchten Tiere sehr beträchtlich. Ich habe mich schon früher[1]) über die weite Verbreitung dieser oxydativen Fermente geäußert und will hier nur hervorheben, daß ich diese Fermente in bezug auf ihr Verhalten zum Licht usw. genauer untersucht habe an den Gewebe- usw.-Extrakten folgender Tiere: Larven von Tenebrio molitor, Imagines von Hydrophilus und Dytiscus, sowie eine Ameise (Camponotus), ausgewachsene Raupen von Cossus ligniperda und insbesondere junge, in Nestern überwinternde Räupchen von Porthesia chrysorrhoea. Weniger ausführlich habe ich die Fermentextrakte von Agrion-, Culex- und Ephemeralarven, von Daphnien, Copepoden, Gammariden usw. studiert. Von den ausführlicher untersuchten Organismen sind die Larven von Tenebrio molitor ausgesprochen negativ phototropisch, Hydrophilus und Dytiscus im allgemeinen wechselnd indifferent bis positiv phototropisch. Bei Exemplaren von Dytiscus, welche bei niederer Temperatur überwintert hatten, konnte ich Anfang Januar bei einem Versuch mit 9 Individuen feststellen, daß sie im Wasser bei Zimmertemperatur ausgesprochen negativ phototropisch, abgetrocknet und in demselben, ausgeleerten und getrockneten Gefäß unter gleichen Belichtungsbedingungen dagegen unzweifelhaft positiv phototropische Bewegungen ausführten. Da die Bewegungen der Käfer auf trockner Unterlage außerordentlich viel langsamer und unbeholfener ist, war diese positive Reaktion nicht so deutlich wie die negativ phototropische; immerhin

[1]) Wo. Ostwald, l. c.

war kein Zweifel an ihrer Existenz vorhanden, insofern als nach einigen Minuten sich alle in die Mitte des Gefäßes gesetzte Käfer mit Ausnahme von 1—2 Individuen entweder direkt an die dem Fenster zugewandten Seite der Schale oder doch in die vordere Hälfte derselben begeben hatten. Brachte man die abgetrockneten Käfer wieder in Wasser, so erfolgte wieder eine negativ phototropische Wanderung, obschon nicht in der ausgesprochenen Weise wie beim ersten Versuch. Bei mehrmaligem Wechsel der zwei Versuche wurden beide Orientierungen immer unbestimmter. Sollten weitere Untersuchungen dies Verhalten bestätigen (ich habe damals nur diesen einen, allerdings sehr überzeugenden Versuch ausführen können), so würden dieselben eine Analogie zu dem Verhalten gewisser mariner Gammariden ergeben, welche nach Holmes[1]) im Wasser negativ, auf dem Lande dagegen positiv phototropisch sind. Übrigens habe ich in einigen Fällen, wennschon trotz zahlreicher und vielfacher Variation der Versuchsbedingungen nicht regelmäßig, indifferente oder nur schwach positive Hydrophilus und Dytiscus in abgetrocknetem Zustande durch kurzes Baden mit verdünntem Alkohol ausgesprochen positiv phototropisch machen können, entsprechend dem Loebschen Versuchen mit niederen Crustaceen und Volvox.[2]) Die Intensität dieses positiven Phototropismus war in einigen Fällen so groß, wie ich sie je bei positiv phototropischen Tieren überhaupt gesehen habe. Gleichzeitig fand eine allgemeine Steigerung der Beweglichkeit der Tiere auf trocknem Boden statt. Erwähnen möchte ich noch, daß die betreffenden Spezies zur Zeit ihrer Geschlechtsreife (im Sommer) ausgesprochen positiv phototropisch sind, wie daraus hervorgeht, daß sie an geeigneten Stellen in Schwärmen die elektrischen Lampen umfliegen. Meine Versuche mit diesen Tieren wurden indessen im Winter und Frühling 1906 angestellt. — In ähnlicher Weise waren auch die ausgewachsenen Raupen von Cossus ligniperda indifferent bis schwach negativ phototropisch.

Auf der anderen Seite ist seit den klassischen Untersuchungen J. Loebs bekannt, daß die jungen überwinternden

---

[1]) Holmes, Amer. J. Physiol. 5, 211, 1901

[2]) J. Loeb, Arch. f. d. ges. Physiol. 115, 564, 1906.

Räupchen von Porthesia chrysorrhoea einen ungemein starken positiven Phototropismus zeigen, wie ich dies auch bei allen aus der Umgebung von Leipzig stammenden Exemplaren in jedem Jahre, in welchem ich sie daraufhin untersuchte, bestätigen konnte.

Für eine ausführlichere Untersuchung der betreffenden Fermentextrakte wurden somit Vertreter von ausgesprochen negativ phototropischen Tieren (Larven von Tenebrio, indifferent bis negativen (Raupen von Cossus[1])), indifferent bis positiven (Hydrophilus, Dytiscus) und ausgesprochen positiv phototropischen Organismen (Räupchen von Porthesia chrysorrhoea) gewählt.

Die Herstellung der Extrakte geschah in der Regel derart, daß die zu untersuchenden Körperflüssigkeiten, Gewebe usw. mit Chloroformwasser versetzt, wenn nötig, zerrieben und manchmal sofort nach dem Filtrieren, manchmal nach späterer Zeit auf ihre oxydativen Fermente untersucht wurden. Das Nähere über die Herstellungsart, Konzentration, Alter usw. der Extrakte wird bei den einzelnen Versuchen angegeben werden.

Was die Methoden zur Bestimmung des Gehaltes oder der Wirksamkeit oxydasenhaltiger Extrakte anbetrifft, so sind sie, wie ich in meiner zitierten Arbeit des Näheren erörterte, leider ziemlich ungleichwertig. Während die Geschwindigkeitskonstante der Wasserstoffsuperoxydzersetzung unter vergleichbaren Bedingungen ein sehr genaues Maß für die Wirksamkeit oder Konzentration der Katalase abgibt, ist eine quantitative z. B. kolorimetrische Bestimmung der Guajakperoxydase wegen der Verschiedenartigkeit des Farbtons (gelbgrün bis blauviolett) je nach

---

[1]) J. Loeb hat dagegen früher gefunden, daß sie positiv phototropische Reaktionen zeigten. Sehr wahrscheinlich ändert sich der Sinn der phototropischen Reizbarkeit auch hier mit dem Alter der Tiere.

[2]) Ich möchte noch hinzufügen, daß es mir mit keinem der von J. Loeb gefundenen Mittel (Säure, Alkohol, Ester usw.) gelang, die stark negativ phototropischen „Mehlwürmer" positiv zu machen. Die Larven gehen meist bei sehr kleinen Spuren von Feuchtigkeit schnell zugrunde, was ein Baden mit den betreffenden Substanzen unmöglich macht. Auch bei einer speziellen Versuchsanordnung, bei welcher die Larven nur mit Alkohol in Berührung kommen, fand zwar eine Zerstreuung der negativ phototropischen Ansammlung, nicht jedoch eine positiv phototropische Orientierung statt.

der Herkunft und Art des Extraktes nicht möglich. Nach vergeblichen kolorimetrischen Messungsversuchen habe ich darum eine quantitative Bestimmung der Peroxydase aufgegeben und mich zunächst mit der Feststellung qualitativer Unterschiede begnügt. Wie indessen aus den im folgenden geschilderten Versuchen hervorgehen wird, sind bereits die qualitativen Befunde ziemlich mannigfaltig. Der Übelstand, daß bei solchen qualitativen Bestimmungen immer eine verhältnismäßig große Anzahl von Vergleichsversuchen gemacht werden muß, ist andererseits insofern vorteilhaft, als er eine häufige und mannigfaltige Prüfung der Grundtatsachen veranlaßt. Untersucht wurde speziell die Guajakperoxydase in fast rein wässerigem Medium; einige Tropfen frischer, stets im Dunkeln gehaltener alkoholischer Guajaklösung wurden zu einigen ccm des zu untersuchenden Extrakts unter geeignetem Schütteln zugegeben, so daß eine weißlich getrübte Suspension entstand.[1]) Diese Versuchsanordnung bietet, wie ich früher (l. c. 416 ff.) erörtert habe, einige Vorteile gegenüber dem meist verwandten Verfahren mit einem stärker alkoholischen Medium, namentlich da die Konzentration des Alkohols, wie spezielle, hier noch nicht veröffentlichte Versuche lehrten, von beträchtlichem Einfluß auf die Guajakbläuung ist. In der Regel wurde ohne H_2O_2-Zusatz gearbeitet. Auch hier konnte indessen in vielen Fällen die Stärke oder Schnelligkeit der Bläuung durch Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd erhöht werden. (Siehe die zitierte Arbeit.)

Die Messung der Katalase geschah in normaler Weise durch Titration der Reaktionsgemische mit Schwefelsäure und Kaliumpermanganat. Weitere methodische Einzelheiten sind bei den Versuchen selbst angegeben.

Endlich möchte ich noch bemerken, daß die hier geschilderten Versuche nur eine Auswahl von typischen Beispielen darstellen, derart, daß ich für die meisten derselben Doppel usw.-Versuche nicht mitgeteilt habe. Ich habe über die hier untersuchten Verhältnisse im Laufe des Jahres 1907 ca. 600 Versuchsreihen, die Reihe zuweilen zu 12 und mehr Einzelversuchen angestellt.

[1]) Eine wertvolle, kritische Untersuchung über diese Guajakreaktion, insbesondere der Peroxydase der Milch erschien soeben von P. Waentig, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte XXVI, 464, 1907.

II. Über die Lichtempfindlichkeit tierischer Katalasen.

§ 6. Die Katalase gehört unzweifelhaft zu den weit verbreitetsten Fermenten im tierischen Organismus. Ich habe bisher noch keinen wässerigen Extrakt aus einem tierischen Gewebe usw. gefunden, welcher nicht zu gewissem Grade die Fähigkeit der Wasserstoffperoxydzersetzung gehabt hätte. Bekanntlich vertraten die älteren Autoren die Meinung, daß diese Eigenschaft eine Eigentümlichkeit aller Fermente sei; der Grund hierfür liegt aber zweifellos in der ungeheuren Verbreitung dieses Enzyms. Denn durch systematisches eingehendes Studium wurde zuerst von Jakobsen[1]), in neuerer Zeit wieder von Senter[2]) nachgewiesen, daß die wasserstoffperoxydspaltende Fähigkeit vieler Fermentlösungen unabhängig ist von der spezifischen Fermentwirkung, sowie, daß die Katalase durch fraktionierte Alkoholfällung und durch Erhitzen auf bestimmte Temperaturen von dem zweiten gleichzeitig in der Lösung vorhandenen Ferment zu trennen ist und vice versa. Auch die nähere reaktionskinetische Untersuchung der Blutkatalase von Senter und der Hefekatalase von Issajew[3]), sowie die anschließenden Versuche über die Giftwirkungen gewisser Stoffe führte zur spezifischen Charakterisierung dieses Ferments, und schließlich sei schon hier hervorgehoben, daß der Einfluß der Belichtung auf Extrakte, welche gleichzeitig Guajakperoxydase und Katalase enthalten, für diese zwei Fermente ein gerade entgegengesetzter ist, ein Umstand, der auch für die Spezifität der Katalase spricht.

Ein wichtiger Punkt von weittragender biologischer Bedeutung ist fernerhin der Umstand, daß die Katalase nicht nur Wasserstoffsuperoxyd, sondern anscheinend auch andere Stoffe mit locker gebundenem Sauerstoff zu zersetzen vermag. Dies geht aus der vor kurzem erschienenen Arbeit von W. Ewald[4]) über den Einfluß der Katalase bei der Reduktion des Oxyhämoglobins hervor. Eine nähere, sich auf andere organische Peroxyde erstreckende Untersuchung dieser Beziehung wäre

[1]) Jakobsen, Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**, 340 ff., 1895.

[2]) Senter, Zeitschr. f. physikal. Chem. **44**, 257 ff., 1903.

[3]) Issajew, Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**, 102 ff., 1904; **44**, 546 ff., 1905.

[4]) W. Ewald, l. c.

von großer Wichtigkeit u. a. für die fermentative Theorie der physiologischen Verbrennung.

Die im folgenden beschriebenen Versuche über die Eigenschaften der Katalase wurden direkt mit chloroformwässerigen Gewebeextrakten, d. h. mit Lösungen, welche neben der Katalase noch andere Fermente enthielten, angestellt. Es kann befremden, daß die Untersuchung nicht mit reineren und konzentrierteren Katalaselösungen, wie sie nach den Verfahren von Bergengrün, Jacobson, Senter, Issajew usw. hergestellt werden können, unternommen wurden. Zunächst zeigt folgender Versuch, daß auch aus tierischen Körperflüssigkeiten die Katalase durch fraktionierte Alkoholfällung wenigstens bis zu einem bestimmten Grade gereinigt werden kann.

Versuch 1. Die in ca. 2 ccm Chloroformwasser aufgefangene Hämolymphe zweier Hydrophilus (zusammen annähernd 3 ccm) wurde mit Chloroformwasser auf das Doppelte des Volumens gebracht; sodann wurde 96%iger Alkohol zugegeben, bis eine leichte Trübung der Lösung eintrat (ca. 7 ccm). Der Niederschlag, welcher sich nur sehr langsam absetzte, wurde abzentrifugiert sowie einmal mit ca. 12 ccm 50%igem Alkohol gewaschen, dann filtriert und über Chlorcalcium bei Zimmertemperatur getrocknet. Sodann wurde der durch Tyrosinase und ein natürliches Chromogen in der Hämolymphe schwärzlich gefärbte Niederschlag mit Chloroformwasser einige Stunden stehen gelassen.

Das Filtrat (ca. 25 ccm, alkoholische Lösung von ca. 50%), welches schwachgelblichgrün war, gab trotz seiner großen Verdünnung mit Guajactinktur und H_2O_2 eine sehr kräftige Gu.-Reaktion, die bemerkenswerterweise sogar stärker war als die Reaktion der ursprünglichen (mit ca. 5 Volumen Wasser verdünnten) Hämolymphe. (Über den beschleunigenden oder verstärkenden Einfluß von Alkohol auf die Peroxydasenreaktion siehe in einer späteren Abhandlung). Bei Zusatz von H_2O_2 zeigte das Filtrat noch Katalasenwirkung, wenn schon in deutlich geringerem Maße als die ursprüngliche Lösung.

Der aus der Digeration des (wasserunlöslichen) Niederschlages mit Chloroformwasser gewonnene Extrakt zeigte sehr beträchtliche Katalasenwirkung, welche, wenn schon wegen des Alkoholgehalts ein direkter zahlenmäßiger Vergleich zwischen Filtrat und Niederschlag in bezug auf Fermentgehalt nicht möglich ist, der Wirkung des Filtrates nicht nachzustehen schien. (Über die Wirkung des Alkohols auf die fermentative H_2O_2-Zersetzung wird in einer späteren Abhandlung Näheres mitgeteilt werden.) Dieser Extrakt besaß nicht mehr die Fähigkeit, suspendiertes Guajacharz in Gegenwart von H_2O_2 zu färben; auch nach längerem Stehen setzte sich nur ein sehr schwach gelblichgrün angefärbter Niederschlag ab, der in keinem Fall tiefer gefärbt war als ein in entsprechenden Verhältnissen hergestellter Guajacniederschlag in reiner H_2O_2-Lösung.

Wäscht man den durch Alkoholfällung erhaltenen katalasehaltigen Niederschlag nicht mit einem größeren Volum 50%igen Alkohol aus, so zeigt der wässerige Extrakt noch eine schwache Guajacfärbung; diese nimmt deutlich mit dem Waschen ab.

Über ein Mittel, umgekehrt Extrakte herzustellen, welche sehr katalasenarm, andererseits aber peroxydasenreich sind, wird weiter unten berichtet werden.

Der Grund dafür, daß ich nicht derartig reinere Katalasenlösungen, sondern die viel komplizierter zusammengesetzten Extrakte untersuchte, war folgender: Die in vorliegender Abhandlung beschriebenen Versuche wurden weit weniger zwecks Studiums der genauen kinetischen Eigenschaften der Fermente als vielmehr mit der Absicht angestellt, nach einer Parallele zwischen dem Verhalten der genannten Fermente gegen Belichtung und den phototropischen Erscheinungen der Tiere zu suchen. Es ist von vornherein wahrscheinlich, daß derartige eventuell bestehende Beziehungen deutlicher zum Vorschein treten, wenn die zur Untersuchung gelangenden Körpersäfte und -extrakte so wenig als möglich durch Isolierungs-, Reinigungs- usw. Methoden verändert werden. Jedenfalls erlauben Versuche mit frischen, unter möglichster chemischer und physikalischer Schonung hergestellten Extrakten mit größerer Annäherung Schlüsse auf ein entsprechendes Verhalten der Stoffe im Tierkörper zu ziehen, als Versuche mit gereinigten, aber sicherlich oft dabei stärker veränderten Fermentlösungen. Es ist ferner anzunehmen, daß die verschiedenen Fermente, zumal die hier in Betracht kommenden sich im Tierkörper in bezug auf ihre Tätigkeit gegenseitig beeinflussen; nimmt man dies an, so muß eine derartige Beziehung auch, vielleicht erst recht bei intensiverer Einwirkung äußerer Faktoren, z. B. hier der Belichtung, vorhanden sein. Diese Beziehung tritt bei der Untersuchung der isolierten Fermente nicht hervor. Zweifellos ist für eine nähere Analyse der Wirkungsweise der einzelnen Fermente die Verwendung reiner Fermentlösungen vorzuziehen. Bei den vorliegenden biologischen Versuchen, welche zunächst einmal die Frage zu entscheiden hatten, ob in den Körperflüssigkeiten überhaupt photochemische Prozesse, welche zu einer näheren Analyse der phototropischen Reaktion geeignet sind, nachgewiesen werden können, bietet aber die Untersuchung derartig komplexer Systeme (Extrakte) den Vorteil,

daß gleich eine ganze Summe von Variabeln in bezug auf ihr Verhältnis zur Belichtung betrachtet wird. Wenn schon solche Systeme gewöhnlich auch als „tot" bezeichnet werden, so verwirklichen sie doch, eingedenk der Pfefferschen Warnung, größere Annäherungen an die wirklichen biologischen Verhältnisse als ihre isolierten Bestandteile, und man kann mit größerer Berechtigung hoffen, analoge Beziehungen aufzufinden.

Schließlich möchte ich darauf hinweisen, daß die biologischen Verhältnisse selbst insofern dem Wunsche nach Lösungen isolierter Fermente entgegenkommen, als z. B. die frischen Extrakte der jungen überwinternden Räupchen von Porthesia chrysorrhoea ganz ungemein reich an Katalase sind, während eine Guajacreaktion erst nach längerem Stehen der Extrakte an der Luft und im Licht zu erzielen ist. Ebenso sind die Extrakte von getrockneten Ameisen, welche während des Hochzeitsfluges gefangen wurden und stark positiv heliotropisch waren, ziemlich reich an Katalase, weisen aber mit H_2O_2 und Guajac auch nach längerem Stehen keine deutliche Grün- oder Blaufärbung auf. Umgekehrt sind z. B. die Extrakte aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer außerordentlich peroxydasehaltig, wie bereits Biedermann fand[1]), während sie auf der andern Seite zwar immer noch Wasserstoffperoxyd zersetzen, jedoch in Anbetracht ihrer Empfindlichkeit gegen die Guajacprobe nur in sehr geringem Maße resp. bei relativ hoher Konzentration[2]).

Für die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche wurden dementsprechend hauptsächlich Extrakte von überwinternden Porthesia-Räupchen, die ich durch Zerreiben der Räupchen mit Chloroformwasser, Digerieren bei Zimmertemperatur (in der Regel) und Filtrieren herstellte, benutzt Da diese Versuche Anfang 1906 begonnen wurden, mußte ich die Räupchen aus den Nestern herausnehmen resp. sie in bekannter

---

[1]) Biedermann: Arch. f. d. ges. Physiol. 72, 105, 1898.

[2]) Über den bemerkenswerten Umstand, daß die stark positiv phototropischen Räupchen von Porthesia gerade so besonders katalasenreich und peroxydasenarm, die intensiv negativ phototropischen hungernden Mehlwürmer dagegen relativ katalasenarme, dafür aber stark peroxydasenreiche Extrakte liefern, siehe weiter unten. (Kap. IV.)

Weise durch gelindes Erwärmen und Besonnen[1]) herauslocken. Als im Frühling die Räupchen selbständig die Nester verließen, trotzdem ich sie in einem dunkeln und kühlen Keller aufbewahrte, oder aber starben, sah ich mich genötigt, nach einer Methode zu suchen, welche eine, wenn auch nur teilweise Konservierung der Katalase gestattete. Es ergab sich nun, daß durch möglichst schnelles Trocknen der Räupchen (über Chlorcalcium) sowie durch Aufbewahrung in lichtundurchlässigen oder gelben Gefäßen an möglichst kühlen Orten, ein beträchtlicher Teil der Katalase konserviert wurde, so daß ich eine große Anzahl z. B. reaktionskinetischer Versuche sowie Nachprüfungen mit diesem, was Dosierung der Extrakte anbetrifft, sehr bequemen Material anstellen konnte. Selbst nach einem Alter von fast neun Monaten erwies sich dies Material, welches keineswegs in bezug auf Licht- und Temperaturwirkung übermäßig geschützt worden war, als vollkommen brauchbar.

§ 7. Es wäre vielleicht zweckmäßig, der Darstellung der Versuche über den Einfluß des Lichtes auf die Katalase die Untersuchungen voranzuschicken, welche ich über die nähere chemische Kinetik der Katalasenwirkung angestellt habe. Da indessen diese Messungen ziemlich ausgedehnt sind, andererseits aber ihr Hauptinteresse in den Beziehungen zu den entsprechenden kinetischen Studien von Senter über Blutkatalase und von Issajew über Hefekatalase besteht, so seien sie erst später mitgeteilt, hier vielmehr nur vorausgenommen, daß der Verlauf der H_2O_2-Zersetzung durch sämtliche untersuchte tierische Extrakte bei nicht zu großer H_2O_2-Konzentration und bei niederer Temperatur in erster Annäherung sehr gut durch die monomolekulare Geschwindigkeitsformel dargestellt wird. Dasselbe ist bekanntlich von Senter und Issajew gefunden worden, so daß es sich mit gewisser Wahrscheinlichkeit also um ein und dasselbe Ferment handelt.

Zur Versuchstechnik sei noch bemerkt, daß vorwiegend nur mit natürlichem Licht (diffuses, durch Schirme und Filter gehendes sowie direktes Sonnenlicht) gearbeitet wurde. Der

[1]) Durch Erwärmen allein (z. B. im dunkeln Thermostaten) kriechen die Räupchen in der Regel selbst bei Verwendung höherer Temperaturen langsamer aus als bei gleichzeitiger Besonnung, ein Umstand, der eine eingehendere Untersuchung verdiente.

mangelnden Intensitätskonstanz des natürlichen Lichtes entsprechen auf der andern Seite die Vorteile der größeren Intensität, der reicheren Zusammensetzung an Strahlen verschiedener Wellenlänge sowie ganz besonders der Umstand, daß durch diese Versuchsanordnung den natürlichen biologischen Verhältnissen in größerer Annäherung Rechnung getragen werden konnte. Dieser letztere Punkt, der u. a. seine Bedeutung darum hatte, weil in der Regel die Tiere auf ihr natürliches phototropisches Verhalten untersucht wurden, bevor sie oder ihre Organe zu Fermentextrakten verarbeitet wurden, ist mir während dieser ganzen Untersuchung besonderer Berücksichtigung wert erschienen.

Um bei wechselnden Belichtungsbedingungen die Temperatur möglichst konstant zu halten, wurden fast stets tunlichst große Wasserbäder benutzt, stets dann, wenn es sich um längere Versuche handelte. Eigentliche Thermostaten von größerer Konstanz und Handlichkeit standen mir nicht zur Verfügung; indessen habe ich nie eine Temperaturvariation, die größer als 1^0 war, abgelesen. Bei Versuchen mit direktem Sonnenlicht befanden sich die Wasserbäder oft eine längere Zeit vorher im Sonnenlicht, um die größte Temperaturdifferenz und entsprechend den schnellsten Temperaturanstieg möglichst zu vermeiden. Hinzu kommt noch, daß der Temperaturkoeffizient der Katalasenwirkung ein für chemische Reaktionen ungewöhnlich kleiner ist; er beträgt nach Senter[1]) 1.4 bis 1.5 pro 10^0. Endlich aber ergibt sich in einigen Fällen, daß die Wirkung einer eventuellen Temperaturerhöhung z. B. in einem von direktem Sonnenlicht getroffenen Gefäße gerade den entgegengesetzten Einfluß hat wie die Lichtwirkung. Dies gilt z. B. für die Katalase, welche, wie gleich gezeigt werden wird, durch Belichtung zerstört, durch Temperaturerhöhung in den hier in Betracht kommenden Grenzen aber in ihrer Wirkung verstärkt wird.

Um den Einfluß von Licht verschiedener Wellenlänge zu untersuchen, wurden Lichtfilter von gleicher Schichtdicke aus Lösungen von Kaliumbichromat und Methylviolett B verwandt. Es sind dies dieselben Filter, mit welchen Trautz und

[1]) Senter, l. c. 291.

Thomas (loc. cit.) ihre oben angedeuteten interessanten Resultate erhalten haben. Natürlich sind bei Verwendung von Glasgefäßen und Wasserbädern die wichtigen ultravioletten Strahlen so gut wie vollständig ausgeschlossen. Eine Versuchsanordnung mit flachen offenen Schalen unter freiem Himmel schien nur wegen der kaum zu vermeidenden Verdunstung und Verunreinigung durch Staub und Ruß nicht einwandsfrei. Die „Dunkel"-Gefäße waren mehrmals dicht mit Staniol umwickelt und befanden sich stets im selben Wasserbad usw. Quarzgefäße und Quecksilberlicht standen mir nicht zur Verfügung.

§ 8. Meine Versuche über den Einfluß des Lichtes auf die Katalase können in folgende Gruppen geordnet werden:

a) Ein und dieselbe Fermentlösung wurde in verschiedene Portionen geteilt, diese unter verschiedenen Umständen belichtet, und der Einfluß der Belichtung dadurch untersucht, daß Reaktionsgemische von gleicher H_2O_2- und Extraktkonzentration mit den verschieden belichteten Extrakten hergestellt und die Geschwindigkeit der Zersetzung gemessen wurde.

b) Es wurde der Einfluß der Belichtung auf die H_2O_2-Zersetzung selbst untersucht, indem zwei Gemische, welche gleiche Mengen von H_2O_2 und ein und derselben Fermentlösung enthielten, verschiedenen Beleuchtungsbedingungen ausgesetzt wurden.

c) Es wurden lebende Tiere wechselnden Belichtungsverhältnissen ausgesetzt, dann in gleichmäßiger Weise abgetötet, Extrakte, welche ein gleiches Gewicht Tiere auf gleiche Volumina Chloroformwasser enthielten, in möglichst gleichartiger Weise hergestellt und diese Extrakte gemäß der Versuchsanordnung A untersucht.

A.[7] I. Versuche mit Extrakten aus unmittelbar vor der Herstellung getöteten Tieren.

§ 9. Versuch 2 (Va). 20 im Dunkeln und Kühlen gehaltene lebende Räupchen von Porthesia chrysorrhoea wurden mit 20 ccm Chloroformwasser verrieben, die Flüssigkeit abfiltriert. Ein Teil dieses Extraktes wurde in ein Kölbchen gegeben, das dicht mit Stanniol umwickelt war, ein anderer Teil wurde in ein gleiches unbewickeltes Kölb-

chen gebracht; beide Gefäße wurden unter gleichen Bedingungen im Wasserbad in die ziemlich kräftige Sonne (April) gestellt. Temp. ca. 22°. Nach einer Stunde Bestrahlung wurde in zwei Reagensröhren mit je 10 ccm ca. $\frac{H_2O_2}{50}$ je 1 ccm der Extrakte hineingegeben und beide Röhrchen bei Zimmertemperatur (ca. 17°) in diffusem Lichte stehen gelassen. Nach zwei Stunden wurde die Reaktion durch Zugießen von konzentrierter Schwefelsäure in beiden Gefäßen zum Stillstand gebracht und die noch vorhandene H_2O_2-Menge mit $\frac{KMnO_4}{500}$ titriert. Es ergab sich

Anfangstiter: 10 ccm $H_2O_2 = 28.0$.

Hell:		Dunkel:	
nach 2 Std.	27.2	nach 2 Std. . .	16.0
Zersetzte H_2O_2-Menge:	0.8 = 2.7%	Zers. H_2O_2-Menge:	12.0 = 46.4%

Berechnet man gemäß der monomolekularen Geschwindigkeitsformel die Konstanten der Zersetzung, so erhält man für „Hell" den Wert .00010, für „Dunkel" den Wert .00203. Es ergibt sich also, daß durch die einstündige, allerdings kräftige Bestrahlung durch direktes Sonnenlicht, der Katalasengehalt der Lösung auf weniger als ein Zwanzigstel des ursprünglichen Gehaltes gesunken war.

Versuch 3 (N 23). Ungefähr drei Tropfen Hämolymphe eines mit Chloroform getöteten weiblichen Dytiscus marginalis wurden mit ca. 20 ccm Chloroformwasser verdünnt, je 2 ccm des filtrierten, schwach gelblichgrünen Extraktes, der qualitativ mit H_2O_2 eine ungemein lebhafte Sauerstoffentwicklung gab, wurden in ein verdunkeltes und in ein helles Reagensrohr gebracht. Beide Röhrchen im Wasserbad in die schwache Sonne (November). Temp. 13—14°. Nach einer Stunde Bestrahlung zu jedem Röhrchen 10 ccm verdünnte H_2O_2-Lösung. Nach sehr energischer halbstündiger Reaktion

Anfangstiter: 10 ccm $H_2O_2 = 34.2$ ccm $\frac{KMnO_4}{500}$[1])

Hell:		Dunkel:	
nach 30′	1.8	nach 30′	1.2
Zersetzung H_2O_2:	32.4 = 94.7%	Zersetzung H_2O_2:	33.0 = 96.8%

Die Geschwindigkeitskonstanten ergeben sich zu .00929 für „Hell" und .01520 für „Dunkel". Der Unterschied ist in diesem Falle zwar kleiner als im vorigen Versuche, jedoch zweifellos größer als etwaige Versuchsfehler betragen können. Der Grund dafür ist, wie aus den folgenden Versuchen her-

[1]) Alle Titrationen in der vorliegenden Arbeit wurden mit $\frac{KMnO_4}{500}$, von dem ein großer Vorrat auf einmal hergestellt worden war, ausgeführt.

vorgeht, erstens darin zu suchen, daß die Bestrahlung ziemlich schwach, die Temperatur fast 10° niedriger als bei vorigem Versuch, sowie die Extrakte außerordentlich katalasenreich sind. Ferner treten aus reaktionskinetischen Gründen bei einer fast vollständigen Zersetzung wie in diesem Versuch in beiden Gefäßen die vorhandenen Geschwindigkeits- resp. Fermentkonzentrationsunterschiede naturgemäß nur sehr wenig hervor. — Dieser Versuch wurde mitgeteilt, um zu zeigen, unter welchen Versuchsbedingungen die im allgemeinen sehr deutliche Lichtwirkung scheinbar in nur sehr geringem Maße zur Geltung kommt.

Versuch 4 (Nr. 34). Ein verdünnter Dytiscus-Hämolymphe-Extrakt, welcher ca. 30 Stunden im Dunkeln resp. in schwachem, diffusem Lichte gestanden hatte, wurde in zwei Portionen geteilt, von denen eine verdunkelt, die andere frei der Sonne (ziemlich schwach, November) ausgesetzt wurden. Temperatur (des Wasserbades) ca. 14°. Nach vier Stunden Bestrahlung wurden je 2 ccm Extrakt mit 10 ccm H_2O_2 gemengt und je 5 ccm titriert.

Anfangstiter: 14.5 (berechnet).

1. Hell: nach 20′ 10.2	Dunkel: nach 20′ 8.1
Zersetzung H_2O_2: 4.3 = 29.6 %	Zersetzung H_2O_2: 6.4 = 44.1 %
2. Hell: nach 35′ 8.1	Dunkel: nach 35′ 6.1
Zersetzung H_2O_2: 6.4 = 44.1 %	Zersetzung H_2O_2: 8.4 = 57.9 %

Der Unterschied zwischen den in beiden Lösungen wirkenden Fermentkonzentrationen beträgt nach 20′ (in Prozenten ausgedrückt) 14.5, nach 35′ 13.8. Dieses Abnehmen des Unterschiedes während der zweiten Hälfte der Reaktion demonstriert die Richtigkeit des bei der Besprechung des vorigen Versuches Gesagten.

Berechnet man die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen, unter der Annahme, daß die Reaktion nach dem monomolekularen Schema verläuft, so erhält man

Tabelle 1.

Hell		Dunkel	
t	.4343 K	t	.4343 K
20′	.0126	20′	.0076
35′	.0108	35′	.0072
Mittel:	.0117	Mittel:	.0074

Benutzt wurde zur Berechnung die Integration $.4343\ K = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C_t}$, worin t die Zeit, C_0 das Anfangstiter und C_t den zurzeit vorhandenen Titer darstellt.

Die Konstanten nehmen mit der Reaktionszeit etwas ab; über die Gründe hierfür siehe den II. Teil dieser Untersuchungen (Kap. reaktionskinetische Eigenschaften tierischer Katalasen).

Es ergibt sich beim Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten, daß durch eine vierstündige Bestrahlung unter den geschilderten Bedingungen die Katalase um ca. 37% gestört wird.

Versuch 5 (N. 25). Ein Dytiscus, dessen Leibeshöhle geöffnet und dessen Hämolymphe durch vorsichtiges Auf- und Niederdrücken des geöffneten Körpers in Chloroformwasser ausgespült worden war, wurde ca. 20 Stunden im Halbdunkeln in ungefähr 20 ccm Chloroformwasser belassen, die Flüssigkeit sodann abfiltriert. Sorge war dafür getragen worden, daß einerseits nicht der Darm usw. zerrissen wurde, sowie andererseits, daß durch Verdunsten des Chloroforms sich nicht Bakterien entwickelten. Von diesem Extrakt wurden einige Kubikzentimeter in ein helles und in ein verdunkeltes Röhrchen gegeben, beide Röhrchen in ein Gefäß mit Wasser gegeben und auf dem Experimentiertisch stehen gelassen. Nach ca. 24 weiteren Stunden, während welchen die Röhrchen 4 Stunden direktem, allerdings schwachem Sonnenlicht (November) und ca. 6 Stunden diffusem Lichte ausgesetzt waren, wurde 1 ccm Extrakt mit 10 ccm H_2O_2 gemischt. Temperatur 15.0 bis 15.5°.

Tabelle 2.

Hell			Dunkel		
Zeit in Min.	Titer (5 ccm)	.4343 K_H	Titer (5 ccm)	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	15.6	—	15.6	—	—
20	13.7	.0028	8.4	.0134	4.8
40	12.3	.0026	5.4	.0115	4.4
	Mittel:	.0027	Mittel:	.01295	4.6

Es zeigt sich also, daß durch einfaches Stehenlassen auf dem Experimentiertisch, welcher in 24 Stunden ca. 4 Stunden von der Sonne beschienen war, der Katalasengehalt des Extraktes bis fast auf ein Fünftel seiner ursprünglichen Konzentration vernichtet wird. Dieser Versuch ist vielleicht darum interessant, weil in Aquarien usw. gehaltene lebende Versuchstiere sich oft unter entsprechenden Belichtungsbedingungen befinden. Würde die Zerstörung der Katalase im lebenden Körper in entsprechender Weise vor sich gehen (siehe hierüber spätere Versuche), so würden in der Tat durch Belichtung kräftige chemische und physikalisch-chemische Änderungen im Tierkörper verursacht werden.

Versuch 6 (N. 28). Ein sehr katalasenreicher, frischer Dytiscus-Hämolymphe-Extrakt wurde in ein verdunkeltes und in ein helles Kölbchen verteilt, einige Tropfen Chloroform zugegeben, beide Kölbchen zugekorkt und im Wasserbad dem Licht eines Auerbrenners ausgesetzt.

I. Nach 5 Std. wurden je 2 ccm Extrakt mit 10 ccm H_2O_2 gemischt und nach 5 Min. titriert.

Anfangstiter: 34.2.

Hell: nach 5 Min. 19.4	Dunkel: nach 5 Min. . . 16.8
Zersetzung H_2O_2: 14.8 = 43.3 %	Zersetzung H_2O_2: 17.4 = 50.9 %
Geschwindigkeitskonstante .04925	Geschwindigkeitskonstante .06174

II. Nach weiteren 7 Std. künstlicher Beleuchtung (im ganzen 12 Std.) und weiteren 8 Std. sehr schwacher diffuser natürlicher Beleuchtung (November) wurden weiterhin je 1 ccm Extrakt mit 10 ccm H_2O_2 gemischt sowie nach 15 Min. titriert.

Anfangstiter: 34.2.

Hell: nach 15 Min. . . . 19.8	Dunkel: nach 15 Min. . . 18.0
Zersetzung H_2O_2: 14.4 = 42.1 %	Zersetzung H_2O_2: 16.0 = 46.8 %
Geschwindigkeitskonstante .01716	Geschwindigkeitskonstante .01858

Die Zerstörung der Katalase findet also, wie zu erwarten war, auch bei künstlicher Beleuchtung statt, wenn schon die gefundenen Wirkungen beträchtlich kleiner als bei natürlichem Lichte sind.

Versuch 7 (N. 35). Eine Katalasenlösung wurde, ähnlich wie in Versuch 5, durch Extrahieren eines geöffneten Dytiscuskörpers mit Chloroformwasser hergestellt, filtriert, in zwei Portionen geteilt und in verdunkeltem und hellem Kölbchen zweimal 24 Std. im Wasserbad (verschlossen) stehengelassen. Während dieser Zeit waren die Kölbchen zweimal ungefähr 4 Std. direkter, aber schwacher Sonne (November) ausgesetzt gewesen. Es wurden je 100 ccm H_2O_2 mit 10 ccm Extrakt vermischt und immer 10 ccm titriert. Temperatur 13.5 bis 14°.

Tabelle 3.

Hell			Dunkel			
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	30.8 (ber.)	—	0	30.8 (ber.)	—	—
10	29.5	(.00187)	10	28.1	(.00398)	(2.1)
20	28.7	153	20	26.1	360	2.4
40	26.8	151	40	22.3	351	2.3
60	25.1	148	60	19.1	346	2.3
80	23.6	146	80	16.2	349	2.4
110	21.8	136	110	13.2	334	2.4
140	19.9	135	140	10.4	336	2.4
17½ Std.	4.6	—	17½ Std.	0.4	—	—
	Mittel:	.00145		Mittel:	.00346	2.38

Die ganz aus der Reihe fallenden, eingeklammerten ersten Konstanten rühren zweifellos davon her, daß die Fermentlösungen beim Mischen mit dem H_2O_2 versehentlich nicht vorgekühlt worden waren, sondern eine ca. 4 bis 5° höhere Temperatur besaßen als das Wasserbad, in dem die Gefäße mit H_2O_2 sich befanden. Sonst ist die Übereinstimmung der Konstanten untereinander recht befriedigend, wenn schon ein schwacher Gang zu kleineren Werten unverkennbar ist. Über die Ursache dieses Ganges siehe einen späteren Abschnitt dieser Untersuchung.

Es ergibt sich, daß unter den beschriebenen Versuchsbedingungen die Konzentration der Fermentlösung im Hellen bis unter die Hälfte der im Dunkeln gehaltenen sinkt. Auch ist dieser Unterschied, wie sich aus der Spalte $K_D : K_H$ obiger Tabelle ergibt, während der Dauer fast der ganzen Reaktion konstant. Nur in den allerletzten Reaktionsstadien, in welchen bei dem Reaktionsgemisch mit verdunkeltem Extrakt die Zersetzung praktisch zu Ende ist, wird das Verhältnis ein anderes, insofern, als sich hier die Geschwindigkeitskonstanten assymptotisch einander sowie einem Nullwerte nähern.

Versuch 8 (IV. 30. A). Ein „Normalextrakt“[1]) von lebenden, kühl und dunkel gehaltenen Porthesiaräupchen wurde teils verdunkelt, teils in diffusem Tageslicht (auf dem Experimentiertisch) aufgestellt, jedoch so, daß die Gefäße nicht von direkter Sonne getroffen wurden (März). Nach 3 Tagen wurden je 5 ccm Extrakt mit je 50 ccm H_2O_2 gemischt und je 10 ccm titriert. Temperatur ca. 16.5 bis 17.0°.

Tabelle 4.

Hell			Dunkel			
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	26.2(ber.)	—	0	26.2(ber.)	—	—
45	24.7	.00056	30	22.4	.00227	4.1
75	24.2	46	60	20.5	178	4.1
100	23.9	40	100	18.1	161	4.0

Auch in diffusem Lichte findet also eine beträchtliche Zerstörung des Ferments (auf ca. $^1/_4$ seiner ursprünglichen Wirksamkeit) statt. Gleichzeitig bemerkt man, daß die Konstanten während der Reaktion beträchtlich in beiden Versuchen ab-

[1]) Mit diesem Namen sollen Extrakte bezeichnet werden, welche pro 1 ccm Chloroformwasser 1 Räupchen enthielten.

fallen, und zwar bei beiden um ca. 29 %. (Über die Ursache hierfür siehe das bei der Diskussion des nächsten Versuchs Gesagte). Obgleich sich das Verhältnis der abnehmenden Werte $K_D : K_H$ konstant erhält, ist es unter Umständen von Wert, die „eigentlichen" Geschwindigkeitskonstanten, d. h. damit die Konzentration des Ferments zu Anfang der Reaktion kennen zu lernen. Hierzu läßt sich vortrefflich eine graphische Methode verwenden, welche ich bereits in meiner zitierten Arbeit über das Vorkommen von Oxydasen in Geschlechtszellenextrakten beschrieben und angewendet habe. Diese beruht kurz darauf, daß man die Konstantenwerte auf der einen, die Reaktionszeiten auf der andern Ordinate eines rechtwinkligen Koordinatensystems abträgt, die gewonnenen Punkte durch eine Kurve verbindet und die letztere bis zum Schnittpunkt mit der Konstantenachse verlängert, mit anderen Worten graphisch auf die Zeit 0 extrapoliert. Diese 0-Werte ergeben sich für diesen Versuch zu $K_H^0 = .00083$ und $K_D^0 = .00335$; ihr Verhältnis $K_D^0 : K_H^0$ ist wiederum 4.1.

Versuch 9 (IV. 43). Aus lebenden, im Dunkeln und Kühlen gehaltenen Porthesiaräupchen wurde ein „Normalextrakt" (1 Räupchen pro 1 ccm Chloroformwasser) gemacht und in zwei Portionen geteilt, von denen eine in einem hellen Kölbchen, die andere in einem mehrere Male mit Stanniolpapier umwickelten gleichen Kölbchen, beide mit einigen Tropfen Chloroform aufbewahrt wurden. Beide Gefäße standen auf dem Experimentiertisch nebeneinander und wurden höchstens pro Tag eine Stunde von der schwachen Abendsonne getroffen (April). Nach einer Woche wurden je 5 ccm Extrakt mit 50 ccm H_2O_2 gemischt und je 10 ccm titriert. Temperatur 16.8°.

Tabelle 5.

Hell			Dunkel		
Zeit in Min.	Titer	. 4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	. 4343 K_D
0	27.4 (ber.)	—	0	27.4 (ber.)	—
20	25.7	.00139	20	15.7	.01209
40	24.9	104	30	12.6	1125
80	24.1	070	40	10.2	1073
			50	8.5	1016
			60	7.1	0977

Graphisch extrapoliert ergeben sich

$$K_H^0 = .00190 \qquad K_D^0 = .01425$$

$$K_H^0 : K_D^0 = 7.5$$

Neben dem beträchtlichen Unterschied zwischen den „Hell"- und „Dunkel"-Konstanten fällt vor allen Dingen wieder auf, daß die Werte der Konstanten während des Reaktionsverlaufes stark abnehmen. Der Grund hierfür liegt nur zum Teil in der relativ hohen Reaktionstemperatur (16.8), welche, wie z. B. aus den Senterschen Arbeiten über die Blutkatalase bekannt ist und von mir auch für tierische Katalasen gefunden wurde (siehe den II. Teil dieser Untersuchungen), die Zerstörung des Ferments während der Reaktion begünstigt. Ganz im allgemeinen habe ich vielmehr gefunden, daß eine Fermentlösung um so leichter während der Reaktion zerstört (oxydiert) wird, je älter und je schwächer sie geworden ist. Dies gilt nicht nur für eine Schwächung der Fermentlösung durch Belichtung, sondern auch für ihre langsame Abschwächung im Dunkeln unter sterilen Bedingungen. Folgender Versuch zeigt dies Verhalten u. a.

Versuch 10 (IV. 40 u. 41). Ein verdünnter (ca. halb-„normaler") Extrakt aus lebenden Porthesiaräupchen wurde in ein möglichst dicht mit Stanniol umkleidetes Kölbchen gegeben und dieses überdies ins Dunkle gestellt. Es wurden stets 5 ccm Extrakt mit 50 ccm H_2O_2 gemischt und je 10 ccm titriert.

I. Sofort nach der Herstellung des Extraktes; Temperatur 17.4°.

Tabelle 6.

Zeit in Min.	Titer	.4343 K
0	27.5 (ber.)	—
15	22.8	.00543
30	18.9	543
45	15.6	545
60	13.1	537
75	11.1	512

II. Nach ca. 24 Std. im Dunkeln bei ca. 16 bis 18°; Temperatur der Reaktion 16.8°.

Tabelle 7.

Zeit in Min.	Titer	.4343 K
0	27.3 (ber.)	—
15	22.9	.00509
25	20.4	506
50	15.4	497
60	14.2	473
80	11.4 (?)	474 (?)

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß einerseits der absolute Wert von K heruntergegangen ist, sowie andererseits, daß trotz der etwas niedrigeren Temperatur des 2. Versuchs die Abnahme der Konstanten eine deutlichere, regelmäßigere und, wenn man von der letzten, sicherlich fehlerhaften Beobachtung in der zweiten Tabelle absieht, auch prozentual größere ist. Vergleicht man z. B. die Abnahme nach 60 Minuten, so betragen dieselben beim ersten Versuch 0.92 % vom Anfangswert, beim zweiten dagegen schon 7.07 %.

§ 10. Versuch 11. (N. 24). Ein frischer Dytiscus-Hämolymphe-Extrakt wurde in vier Reagensröhren verteilt, welche wiederum in weiten Röhren mittels durchlochter Korke befestigt wurden. Eine der großen Röhren wurde mit reinem Wasser gefüllt, in einer zweiten ebenfalls nur mit Wasser gefüllten wurde das Reagensgläschen mit der Fermentlösung mehrere Male dicht mit Stanniol umwickelt, eine dritte Röhre enthielt als Gelbfilter gesättigte Kaliumbichromatlösung, eine vierte ähnlich eine dunkle, aber noch durchsichtige Lösung von Methylviolett B als Violettfilter. Ich verwandte die letzteren Farbfilter insbesondere aus dem Grunde, weil Trautz und Thomas ihre oben angeführten interessanten Resultate über eine bald beschleunigende und bald verzögernde Lichtwirkung gerade mit diesen Farblösungen erhalten hatten. Alle vier Röhren wurden mit dicken Stanniolkappen verschlossen und unter ganz gleichen Bedingungen belichtet.

I. Nach $2^1/_2$stündiger Bestrahlung durch ziemlich starke direkte Sonne (November) wurden je 1 ccm Extrakt mit 10 ccm H_2O_2 gemischt und je 5 ccm titriert. Temperatur 15 bis 16°.

Tabelle 8.

	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Titer	.4343 K_D	Titer	.4343 K_G	Titer	.4343 K_V
0	15.6(ber.)	—	15.6(ber.)	—	15.6(ber.)	—	15.6(ber.)	—
20	13.8	.00266	10.2	.00923	11.8	.00606	12.5	.00481
40	12.5	281	7.3	829	9.5	539	10.6	420
	Mittel:	.00274	Mittel:	.00876	Mittel:	.00573	Mittel:	.00451

Abgesehen bei den Versuchen mit „Hell"-Extrakt nehmen die Konstanten, zweifellos wegen der hohen Versuchstemperatur (siehe später) stark ab. Nimmt man das Mittel derselben, so verhalten sich die Geschwindigkeitskonstanten resp. Fermentkonzentrationen bezogen auf die Konstante des „Dunkel"-Extraktes gleich 1

$$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.31 : 1 : 0.65 : 0.51.$$

II. Nachdem derselbe Extrakt noch weiteren 2 Stunden Sonne (im ganzen also $4^1/_2$ Stunden) sowie ca. 8 Stunden diffusem Tageslicht ausgesetzt gewesen war, wurden wiederum je 1 ccm Extrakt mit 10 ccm H_2O_2 gemischt und je 5 ccm titriert. Temperatur ca. 21°.

Tabelle 9.

	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Titer	.4343 K_D	Titer	.4343 K_G	Titer	.4343 K_V
0	15.6(ber.)	—	15.6(ber.)	—	15.6(ber.)	—	15.6(ber.)	—
20	12.6	.00464	9.1	.01170	10.8	.00799	10.9	.00778
40	9.9	494	5.8	1074	7.8	753	8.0	725
	Mittel:	.00479	Mittel:	.01122	Mittel:	.00776	Mittel:	.00752

Aus diesem Versuch ergibt sich

$$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.43 : 1 : 0.69 : 0.67.$$

Dieser Versuch zeigt also, daß die Wellenlänge des Lichtes einen bedeutenden Einfluß auf die Zerstörung der Katalase hat, insofern als bei kürzerer Beleuchtung violettes Licht ähnlich stark wie weißes Licht wirkt, während die Strahlen kürzerer Wellenlänge viel weniger schädigen. Bei längerer Bestrahlung verwischen sich diese Unterschiede etwas, und namentlich nähern sich die Konstanten für gelbes und violettes Licht.

Der Einfluß des ultravioletten Lichtes war bei diesen Versuchen so gut wie vollständig ausgeschaltet, da das Licht durch drei bis vier Glaswände und zwei Flüssigkeitsschichten zu gehen hatte. Spezielle Versuche über die Wirkung auch des ultravioletten Lichtes habe ich aus Mangel an geeigneten Gefäßen nicht anstellen können.

Es sei schon hier bemerkt, daß der konstatierte Einfluß der Wellenlänge des Lichtes genau dem Verhalten sowohl phototropischer Tiere als auch Pflanzen in verschiedenfarbigem Lichte entspricht. Auch hier wirken bekanntlich allgemein violette Strahlen ähnlich wie weißes Licht, während gelbe bzw. rote Strahlen nur eine schwache phototropische Reaktion hervorrufen.

A. II. Versuche mit Extrakten aus getrockneten Tieren.

§ 11. Versuch 12. (N. 21). Ein Extrakt aus 9 Monate alten getrockneten Räupchen von Porthesia chrysorrhoea wurde dadurch hergestellt, daß 0.17 g Räupchen mit 64 ccm Chloroformwasser zerrieben,

das Gemisch ca. eine Stunde stehengelassen sowie filtriert wurde. In ein verdunkeltes und in ein helles Röhrchen wurden je 2 ccm Extrakt gegeben, die Röhrchen im Wasserbad in die Sonne (ziemlich schwach, November) gestellt, nach einer Stunde Bestrahlung je 10 ccm H_2O_2 dazu gemischt sowie die Röhrchen während der H_2O_2-Zersetzung in schwaches diffuses Tageslicht gebracht. Temperatur ca. 17.5°.

Tabelle 10.

Hell			Dunkel			
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	34.2	—	0	34.2	—	—
60	2.9	.00119	60	2.4	.00256	2.2

Das Ferment war also auch in diesem Falle mehr als zur Hälfte zerstört worden.

Versuch 10. (N. 26). Ein auf ähnliche Weise hergestellter zweiter Extrakt aus getrockneten Porthesia-Räupchen wurde in einem verdunkelten und in einem hellen Röhrchen im Wasserbad vier Stunden von direkter Sonne (November) und fünf Stunden von diffusem Tageslicht bestrahlt. Hierauf wurden je 2 ccm Extrakt mit 10 ccm H_2O_2 gemischt und je 5 ccm titriert.

Tabelle 10a.

Hell			Dunkel			
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	14.3 (ber.)	—	0	14.3 (ber.)	—	—
25′	9.1	.00785	25′	8.5	.00904	1.2

Versuch 13. (N. 22). Es wurde ein Extrakt hergestellt durch Zerreiben von getrockneten großen Ameisen (Camponotus herculeanus) in Chloroformwasser. Die Ameisen, welche in der Mehrzahl geflügelt waren, wurden im Mai gefangen, während sie gerade aus den Spalten einer Holzdiele in großer Menge hervorkamen und lebhaft an das Fenster flogen. Bekanntlich hat schon J. Loeb gefunden, daß die geflügelten Individuen mancher Ameisen zur Zeit ihres Hochzeitsfluges intensiv positiv phototropisch sind; zweifellos befanden sich auch die hier verwandten Camponotusindividuen im Hochzeitsflug.

Dieser Extrakt wurde in einem verdunkelten und in einem erhellten Röhrchen im Wasserbad eine Stunde direkter Sonne (November) ausgesetzt, darauf je 2 ccm Extrakt mit 10 ccm H_2O_2 vermischt und 10 ccm titriert. Temperatur ca. 17.0°.

Tabelle 11.

Hell			Dunkel			
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	34.2	—	0	34.2	—	—
60	21.7	.00329	60	20.9	.00356	1.08

Wenn schon der Unterschied zwischen „Hell" und „Dunkel" nicht sehr beträchtlich ist, so ist er doch zweifellos größer als die möglichen Versuchsfehler.

Versuch 14 (N. 37). Ein Extrakt aus getrockneten Porthesia-Räupchen wurde in 4 Portionen geteilt, und, um den Einfluß der Wellenlänge des Lichtes zu untersuchen, in entsprechende Versuchsbehälter mit doppelten Flüssigkeitsbädern, einem Tropfen Chlorofom usw. (siehe Versuch 8) gebracht.

I. Nachdem die Extrakte ca. 30 Stunden alt waren, und unterdessen 2 Stunden in direkter schwacher Sonne und ca. 10 Stunden in sehr schwachem diffusem Tageslicht (dichter Nebel, November) gestanden hatten, wurden je 1 ccm Extrakt mit 10 ccm H_2O_2 gemischt, und je 5 ccm titriert. Reaktionstemperatur 11 bis 12°.

Tabelle 12.

	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Titer	.4343 K_D	Titer	.4343 K_G	Titer	.4343 K_V
0	15.4 (ber.)	—	15.4 (ber.)	—	15.4 (ber.)	—	15.4 (ber.)	—
20	15.0	.00057	14.1	.00192	14.7	.00101	14.9	.00072
60	14.2	.00059	12.7	.00140	13.6	.00090	13.8	.00079
	Mittel:	.00058	Mittel:	.00166	Mittel:	.00096	Mittel:	.00076

Aus diesem Versuch ergibt sich

$$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.35 : 1 : 0.54 : 0.45.$$

II. Dieselben Extrakte wurden in gleicher Versuchsanordnung noch weiterhin ununterbrochen 22 Stunden künstlicher Beleuchtung (Auerbrenner) ausgesetzt. 1 ccm Extrakt wurde mit 10 ccm H_2O_2 gemischt, 5 ccm titriert. Temperatur 16°.

Tabelle 13.

Zeit in Min.	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
	Titer	.4343 K_H	Titer	.4343 K_D	Titer	.4343 K_G	Titer	.4343 K_V
0	15.4(ber.)	—	15.4(ber.)	—	15.4(ber.)	—	15.4(ber.)	—
60	13.9	.00074	11.3	.00223	11.7	.00199	13.3	.00106

Aus diesem Versuch ergibt sich

$$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.33 : 1 : 0.89 : 0.47.$$

Es zeigt sich also, daß wiederum „hell" und „violett" sehr ähnlich gewirkt haben, während auf der anderen Seite „dunkel" und „gelb" einander entsprechen. Für diese Tatsache sind die Verhältniszahlen dieses Versuches besonders charakteristisch.

§ 12. Zusammenfassung: Es ergibt sich aus den Versuchen der Gruppe A, daß die Katalasen-Extrakte sowohl von Tieren, welche durch Chloroform kurz vor der Herstellung der Fermentlösungen getötet wurden, als auch von getrockneten und möglichst lichtdicht aufbewahrten Tieren gegen Belichtung empfindlich sind und durch dieselbe zerstört werden. Was den Einfluß der Wellenlänge des Lichtes anbetrifft, so nimmt die zerstörende Wirkung bei beiden Extraktarten ab in der Reihenfolge: weiß, violett, gelb, dunkel. Auch künstliches Licht (Auerbrenner) zerstört die Katalase. Ferner stellt sich heraus, daß im allgemeinen Extrakte aus frischen Tieren lichtempfindlicher sind, d. h. schneller zerstört werden als Extrakte aus getrocknetem Material. Auf der andern Seite sind durch Licht sowohl als auch durch Alter (im Dunkeln) geschwächte Katalasen-Extrakte empfindlicher gegen die zerstörende (oxydierende) Wirkung des H_2O_2 während der Reaktion. Die Geschwindigkeitskonstanten zeigen daher bei Versuchen mit durch Licht oder Alter geschwächten Fermentextrakten während der Reaktion einen stärkeren, abnehmenden Gang als die Konstanten von Versuchen mit frischen Extrakten. Die wiedergegebenen Versuche beziehen sich auf frische Extrakte von Porthesia-Räupchen, Dytiscus (Imagines, Hämolymphe usw.) und auf Extrakte von getrockneten Porthesia-Räupchen und geschlechtsreifen Ameisen (Camponotus).

B. Versuche über den Einfluß der Belichtung auf die H_2O_2-Zersetzung selbst.

§ 13. Versuche, welche zunächst den Zweck hatten, festzustellen, ob ein Einfluß der Belichtung während der Reaktion selbst vorhanden ist, ergaben zunächst das allgemeine Resultat, daß in der Tat auch bei dieser Versuchsanordnung eine beträchtliche Lichtwirkung nachweisbar ist. Folgende Beispiele demonstrieren dies Verhalten.

Versuch 15 (III. 5). Von einem sehr verdünnten, aber ursprünglich sehr katalasenreichen Extrakt aus lebenden Porthesia-Räupchen wurde je 1 ccm zu je 10 ccm H_2O_2 gegeben. Das eine der Versuchsröhrchen war dicht mit Stanniol umwickelt worden; beide befanden sich im Wasserbad. Temperatur ca. 17.5°. Die Röhrchen wurden 30 Minuten der Sonne (März) ausgesetzt.

Anfangstiter: 26.1

Hell: nach 30 Minuten . . 14.3	Dunkel: nach 30 Minuten . 11.9
Zers. H_2O_2: 11.8 = 45.4%	Zers. H_2O_2: 14.2 = 50.8%
.4343 K_H = .00871	.4343 K_D = .01131

$K_D : K_H = 1.3.$

Versuch 16. Ein sehr verdünnter Extrakt von lebenden Porthesia-Räupchen wurde mit ziemlich verdünnter $\left(\text{ca. } \frac{m}{400}\right)$ H_2O_2-Lösung gemischt, und zwar wurden in ein helles und in ein mit Stanniol dicht umwickeltes Kölbchen je 1 ccm Extrakt und 20 ccm H_2O_2 gegeben. Beide kamen im Wasserbad in die starke Sonne (März); Bestrahlungsdauer 1 Stunde; Temperatur ca. 19°.

Anfangstiter: 7.6

Hell: nach 60 Minuten . . . 3.9	Dunkel: nach 60 Minuten . . 2.7
Zers. H_2O_2: 3.7 = 48.7%	Zers. H_2O_2: 4.9 = 64.5%
.4343 K_H = .00483	.4343 K_D = .00749

$K_D : K_H = 1.55.$

Versuch 17 (III. 6 u. 7). Mit einem andern Extrakt aus lebenden Porthesia-Räupchen wurden folgende zwei Versuche gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen, aber mit verschiedenen H_2O_2-Konzentrationen angestellt. Temperatur 16,5 bis 17,0°.

I. 10 ccm ca. $\frac{H_2O_2}{50}$ + 1 ccm Extrakt
II. 10 ccm ca. $\frac{H_2O_2}{100}$ + 1 ccm Extrakt
} beide 30 Minuten in direkte Sonne (März).

I. Anfangstiter: 30.1

Hell: nach 30 Minuten . . 20.0	Dunkel: nach 30 Minuten . 18.8
Zers. H_2O_2: 10.1 = 33.5%	Zers. H_2O_2: 11.3 = 37.5%
.4343 K_H = .00592	.4343 K_D = .00681

$K_D : K_H = 1.15.$

II. Anfangstiter: 15.1

Hell: nach 30 Minuten . . . 9.7	Dunkel: nach 30 Minuten . 8.1
Zers. H_2O_2: 5.4 = 35.8%	Zers. H_2O_2: 7.0 = 38.7%
.4343 K_H = .00641	.4343 K_D = .00902

$K_D : K_H = 1.41.$

Versuch 18 (III. 11, 13, 14). Eine entsprechende Versuchsreihe wiederum mit einem andern frischen verdünnten Porthesia-Extrakte ergab folgende Resultate. Belichtung überall durch direktes schwaches Sonnenlicht (März). Temperatur ca. 18°. Die Versuche wurden gleichzeitig angestellt. Immer 10 ccm H_2O_2 + 1 ccm Extrakt.

I. Anfangstiter: 20.7

Hell: nach 2 Stunden . . . 12.5	Dunkel: nach 2 Stunden . . 8.0
Zers. H_2O_2: 8.5 = 41.1%	Zers. H_2O_2: 12.7 = 61.4%
.4343 K_H = .00182	.4343 K_D = .00344

$K_D : K_H = 1.89.$

II. Anfangstiter: 13.5

Hell: nach 2 Stunden . . . 7.4	Dunkel: nach 2 Stunden . . 3.8
Zers. H_2O_2: 6.1 = 45.2%	Zers. H_2O_2: 9.7 = 71.8%
.4343 K_H = .00218	.4343 K_D = .00459

$K_D : K_H = 2.11.$

III. Anfangstiter: 12.0

Hell: nach 2 Stunden . . . 7.2	Dunkel: nach 2 Stunden . . 3.1
Zers. H_2O_2: 4.8 = 40.0%	Zers. H_2O_2; 8.9 = 73.2%
.4343 K_H = .00185	.4343 K_D = .00489

$K_D : K_H = 2.64.$

Aus den Versuchen 17 und 18 geht hervor, daß die zerstörende Wirkung des Lichtes während der Reaktion zunimmt mit abnehmender Konzentration des H_2O_2. Dies geht daraus hervor, daß in beiden Versuchsreihen das Verhältnis $K_D : K_H$ deutlich zunimmt mit der H_2O_2-Verdünnung. In verdünnteren Peroxydlösungen wird also die Katalase durch Licht schneller zerstört. Weiterhin zeigen die Versuche, daß, wie schon Senter für die Hämase fand, die katalytische Reaktion nicht unabhängig von der Konzentration des Substrats, des H_2O_2 ist. Wäre dies der Fall, so müßten sich überall bei den „Dunkel"-Versuchen dieselben Geschwindigkeitskonstanten ergeben, während sie tatsächlich ganz beträchtlich mit abnehmender H_2O_2-Konzentration wachsen. Der Grund für dies Verhalten liegt, wie Senter schon betont hat, zweifellos in der zerstörenden Wirkung des H_2O_2 in den immerhin noch ganz beträchtlichen hier verwandten Konzentrationen sowie in

der relativ hohen Versuchstemperatur. Wie wir im II. Teil dieser Untersuchungen sehen werden, ist die Fermentwirkung bei kleineren H_2O_2-Konzentrationen und niedrigerer Temperatur in erster Annäherung durchaus unabhäng von der Substratkonzentration.

Versuch 19 (N. 15). Von einem Extrakt, der durch Zerreiben von 0.17 g trocknen Porthesia-Räupchen, die eine Stunde gequollen hatten, in 64 ccm Chloroformwasser, Filtrieren usw. hergestellt worden war, wurden je 10 ccm mit je 50 ccm H_2O_2 in einem verdunkelten und in einem hellen Kölbchen gemischt. Beide Gefäße im Wasserbad in die Sonne (November). Temperatur ca. 16°. Es wurden je 10 ccm titriert.

Tabelle 14.

Hell			Dunkel			
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	$K_D : K_H$
0	14.9 (ber.)	—	0	14.9 (ber.)	—	—
32	13.5	.00134	30	13.1	.00186	1.4
47	12.7	147	45	12.6	162	1.1
65	12.1	139	65	11.9	150	1.08

Versuch 20 (N. 20). Von einem außerordentlich starken, frischen Extrakt aus der Hämolymphe von Hydrophilus wurden je 10 ccm mit 100 ccm H_2O_2 in einem verdunkelten und in einem hellen Kolben gemischt. Beide Gefäße kamen im Wasserbad in die Sonne (November). Temperatur ca. 16.5 bis 17.0°. Es wurden je 10 ccm titriert.

Tabelle 15.

Hell			Dunkel			
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	29.7 (ber.)	—	0	29.7 (ber.)	—	—
15	11.4	.0277		10.5	.0301	1.08
25	7.2	246		5.6	290	1.13
40	2.7	260		2.4	273	1.05

Versuch 21 (III. 26). Je 10 ccm eines verdünnten Extraktes aus lebenden Porthesia-Räupchen wurden mit je 10 ccm H_2O_2 in einem durch Stanniolumwicklung verdunkelten und in einem hellen Kölbchen gemischt. Beide Kölbchen wurden im Wasserbad direktem Sonnenlicht ausgesetzt (März). Temperatur 17.0 bis 17.5°. Je 10 ccm wurden titriert.

Tabelle 16.

Hell			Dunkel			
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	13.1 (ber.)	—	0	13.1 (ber.)	—	—
6	12.6	.00282	6	12.4	.00398	1.4
10	12.3	274	10	12.0	381	1.4
20	11.5	283	20	11.4	302	1.1
30	10.8	280	30	10.3	348	1.2
40	10.0	293	40	9.4	380	1.3
50	9.4	288	50	8.6	366	1.3
70	8.5	268	70	7.9	314	1.2
90	7.2	289	90	6.5	337	1.2

Untersucht man die Reaktionen unter dem direkten Einfluß des Sonnenlichts etwas näher, wie dies in Versuch 19, 20 und 21 getan ist, so fällt vor allen Dingen ein merkwürdiges Verhalten auf. Die Konstanten der „Hell"-Versuche nehmen im Verlauf der Reaktion durchaus nicht so stark (infolge Oxydation des Ferments) ab als die Konstanten der Dunkelversuche[1]).

Man sollte erwarten, daß infolge der allmählichen Zerstörung des Ferments durch Licht die Geschwindigkeitskonstanten schon aus diesem Grunde abnehmen würden, ähnlich wie die Konstanten bei längerer Versuchsdauer, höherer Temperatur, größerer H_2O_2- und kleinerer Katalasenkonzentration auch bei Dunkelversuchen wegen der allmählichen Zerstörung des Ferments kleiner werden. Nun ist aber neuerdings von Dreyer und Hanssen in einer schon oben zitierten Arbeit gefunden worden, daß die Zerstörung einiger anderer Fermente durch Licht gemäß der monomolekularen Geschwindigkeitsformel vor sich geht. Leider erschien diese Arbeit erst nach Abschluß des

[1]) Die mitgeteilten drei Versuche sind vollkommen unabhängig voneinander und überdies mit dreierlei Material zu verschiedenen Zeiten angestellt worden. Sie sind zur Illustration des im Texte angegebenen Verhaltens nur wegen der drei verschiedenen Extraktarten ausgewählt worden; sämtliche Doppel- usw. Versuche ergaben dasselbe Resultat. Ferner wurde die Berechnung des Resultates erst nach dem Anstellen sämtlicher hier geschilderter Versuche ausgeführt. — Diese Bemerkung erscheint mir in Anbetracht des schwachen, wenn schon unverkennbar bezeichneten Unterschiedes zweckdienlich.

experimentellen Teiles sowie nach Niederschrift der entsprechenden Kapitel dieser Untersuchungen, so daß ich eine Prüfung dieser Gesetzmäßigkeit auch für die Katalase auf den zweiten Teil dieser Arbeit verschieben mußte. Diese von Dreyer und Hanssen gefundene Gesetzmäßigkeit besagt nun unter anderem, daß während der Anfangsstadien der Reaktion die zerstörende Wirkung des Lichtes relativ sehr groß sein und im Verlaufe der Reaktion verhältnismäßig abnehmen wird. Fände die Zerstörung der Katalase durch Licht ebenfalls gemäß der ersten Reaktionsordnung statt, so sollte man erwarten, daß zu Anfang der Reaktion die Differenz zwischen den „Hell"- und „Dunkel"-Geschwindigkeitskonstanten am größten ist und während des Verlaufs der Reaktion allmählich kleiner wird. In der Tat entspricht nun auch das experimentelle Resultat dieser theoretischen Forderung, indem in allen drei Versuchen das Verhältnis $K_D : K_H$ im Verlaufe der Reaktion kleiner wird, ein Verhalten, das, wie aus den früher gegebenen Tabellen hervorgeht, durchaus im Gegensatz steht zu der regelmäßig beobachteten Konstanz dieses Verhältnisses bei Versuchen, in denen Lichtwirkung und H_2O_2-Zersetzung zeitlich getrennt untersucht wurden. Überdies erklärt die Annahme der monomolekularen Reaktionsformel auch für die Lichtzerstörung der Katalase den sonst merkwürdigen Umstand, daß schon nach so kurzer Zeit (5 Minuten usw.) die „Hell"-Konstante einen beträchtlich geringeren Wert als die „Dunkel"-Konstante zeigt.

Unerklärt bleibt jedoch noch der merkwürdige Umstand, daß die Werte der „Hell"-Konstanten einen viel schwächeren Gang im Laufe der Reaktion zeigen als die „Dunkel"-Konstanten. Eine theoretische Erklärungsmöglichkeit kann auf Grund meiner bisherigen Versuche leider noch nicht entschieden werden. Versucht man festzustellen, nach welcher Gesetzmäßigkeit die Zerstörung des Ferments durch H_2O_2 vor sich geht, so kämen insbesondere zwei Reaktionsformen in Frage: Einerseits könnte die Zerstörung relativ zunehmen, andererseits im Laufe der Reaktion relativ abnehmen. Bei Untersuchung nun sämtlicher hierzu geeigneter Versuche fand ich ein sehr unregelmäßiges Verhalten, indem beide Reaktionsformen oder aber auch ein ganz unregelmäßiges Springen der Konstantenwerte festzustellen war, ohne daß es mir bisher ge-

lungen ist, eine strengere Zuordnung dieses Verhaltens zu Extraktarten, den Versuchsbedingungen usw. aufzufinden. Relativ häufig fanden sich zunehmende Zerstörungsgeschwindigkeiten bei Porthesia-Extrakten[1]), abnehmende dagegen bei den Extrakten aus den Geschlechtszellen von Amphibien (siehe meine zit. Arb.). Die wenigen Versuche von Senter über Hämase, welche sich in diesem Sinne verwenden lassen, zeigen ebenfalls eine im allgemeinen während des Reaktionsverlaufs abnehmende Zerstörungsgeschwindigkeit.[2])

Würde sich nun bei eingehenderen Untersuchungen herausstellen, daß zum wenigsten die hier untersuchten Extraktarten mit zunehmender Geschwindigkeit zerstört würden, so könnte man an ein gewisses Gleichgewicht denken, insofern als zu Anfang der Reaktion der zerstörende Lichteinfluß vorwiegend, der langsamere Oxydationsprozeß durch H_2O_2 dagegen in nur geringfügigem Maße, im späteren Verlaufe der Reaktion dagegen die H_2O_2-Zerstörung des Ferments vorwiegend, der Lichteinfluß dagegen in geringerem Grade die Geschwindigkeitskonstanten herabsetzen wird. Zu berücksichtigen ist hierbei noch die im vorigen Abschnitt festgestellte Tatsache, daß durch Licht geschwächte Extrakte empfindlicher gegen die zerstörende Wirkung des H_2O_2 sind, oder daß m. a. W. der zweiten den Wert der Konstanten verringernden Reaktion hier ein ganz besonders starker Einfluß zukommt. Übrigens geht aus den drei letzten Versuchen deutlich hervor, daß auch bei den „Hell"-Reaktionen die Konstanten in den späteren Reaktionsstadien allmählich abfallen. Durch die Summation der zwei das Ferment zerstörenden Reaktionen könnte sich also eine von Beginn der Reaktion an ungefähr gleich große Herabsetzung der Geschwindigkeitskonstanten der „Hell"-Reaktion ergeben bis zu den Reaktionsstadien, bei welchen die Licht-

---

[1]) Der in Tabelle 16 mitgeteilte Versuch ist gerade hierfür kein gutes Beispiel.

[2]) Auch in den entsprechenden Versuchen von Faitelowitz mit Milch, auf welche mich Herr Prof. Bredig freundlichst aufmerksam machte, nehmen die Konstanten in unregelmäßiger Weise bald mit zunehmender und bald mit abnehmender Geschwindigkeit ab. (Studie zur Kenntnis der Milchkatalyse des Wasserstoffsuperoxyds usw. Heidelberg. Dissertation 1904.

reaktion langsamer als die H_2O_2-Oxydation des Ferments geworden ist, ein Umstand, der sich in dem allmählichen Abfallen auch der „Hell"-Konstanten zeigt. — Die Zulässigkeit dieser Erklärung hängt indessen, wie bemerkt, davon ab, daß ein eingehenderes Studium mit Regelmäßigkeit eine zunehmende Geschwindigkeit der H_2O_2-Oxydation des Fermentes ergibt.

Für die verhältnismäßig großen unregelmäßigen Schwankungen der „Dunkel"-Konstanten ist zweifellos die Versuchsanordnung verantwortlich zu machen, indem es schwer ist, bei der Probeentnahme zwecks Titrierung zu vermeiden, daß durch die Öffnung des Gefäßes oder durch Bestrahlung des in die Pipette gesogenen Volums das Reaktionsgemisch nicht einer kurzen Belichtung ausgesetzt wird.

§ 14. Versuch 22 (III. 23). Je 1 ccm eines sehr verdünnten Extraktes aus lebenden Porthesia-Räupchen wurden in vier Gefäße gegeben, welche gemäß der oben beschriebenen Versuchsanordnung zum Studium des Einflusses der Wellenlänge hergerichtet worden waren, und darauf mit je 10 ccm H_2O_2 gemischt. Kräftige direkte Sonne (März). Temperatur des Wasserbades ca. 16.5°.

Tabelle 17.

	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343K_H	Titer	.4343K_D	Titer	.4343K_G	Titer	.4343K_V
0	26.1	—	26.1	—	26.1	—	26.1	—
135	23.0	.00041	20.6	.00079	20.6	.00079	21.8	.00057

$$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.52 : 1 : 1 : 0.57$$

Versuch 23 (III. 25). Je 1 ccm eines starken Extraktes aus lebenden Porthesia-Räupchen wurden bei gleicher Versuchsanordnung mit je 10 ccm H_2O_2 gemischt. Direkte Sonne (März). Temperatur ca. 17°.

Tabelle 18.

	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343K_H	Titer	.4343K_D	Titer	.4343K_G	Titer	.4343K_V
0	26.1	—	26.1	—	26.1	—	26.1	—
120	12.2	.00273	7.8	.00437	8.3	.00414	11.3	.00303

$$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.63 : 1 : 0.95 : 0.69$$

Versuch 24 (III. 50). Je 5 ccm eines verdünnten Extraktes aus getrockneten Porthesia-Räupchen wurden bei gleicher Versuchsanordnung mit je 20 ccm H_2O_2 gemischt. Direkte kräftige Sonne (März). Temperatur 16.5 bis ca. 17.5°.

Tabelle 19.

	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343K_H	Titer	.4343K_D	Titer	.4343K_G	Titer	.4343K_V
0	13.8(ber.)	—	13.8(ber.)	—	13.8(ber.)	—	13.8(ber.)	—
20[1])	12.7	.0017	12.1	.0029	12.2	.0027	12.3	.0025
40	11.9	16	10.8	27	10.7	28	10.9	26
60[1])	11.0	16	9.0	31	9.2	29	9.3	29
80	10.3	16	7.8	31	7.9	30	8.2	28
	Mittel: .00163		Mittel: .00300		Mittel: .00285		Mittel: .00270	

$$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.54 : 1 : 0.95 : 0.90$$

Die Versuche über den Einfluß der Wellenlänge des Lichts (Versuch 22, 23 und 24) auf die H_2O_2-Zersetzung selbst ergeben also, wie zu erwarten war, dasselbe Resultat wie die im vorigen Abschnitt mitgeteilten, entsprechenden Versuche; die Reihenfolge der Lichtwirkung ist wieder: Hell > Violett > Gelb > Dunkel. Bei einem eingehenderen Versuche (Tab. 19) fällt wiederum die große Konstanz der „Hell"-Konstanten im Gegensatz zu den Konstanten aller übrigen Versuche auf. Bei dem „Hell"-Versuch deuten die Konstanten außerdem einen schwachen sinkenden Gang an, während die Konstanten der übrigen Versuche deutlich steigen. Der Grund für dies abnorme Verhalten liegt zweifellos zum größten Teile an den Versuchsbedingungen, indem sich bei der intensiven Wärmestrahlung der Sonne gerade bei diesem Versuch eine allmähliche Temperatursteigerung von ca. 1.5° nicht vermeiden ließ.

§ 15. Zusammenfassung: Die Versuche der Gruppe B zeigen, daß auch während der H_2O_2-Zersetzung selbst die Belichtung einen deutlichen hemmenden Einfluß auf die Geschwindigkeit der Reaktion hat. Im einzelnen ergibt sich erstens, daß diese Lichtwirkung zunimmt bei Verdünnung

[1]) Für den „Hell"-Versuch wurde die erste Titration nicht nach 20, sondern nach 21 Minuten, die dritte nicht nach 60, sondern nach 61 Minuten unternommen.

des Substrates (H_2O_2). Zweitens zeigt es sich, daß auch die belichtete Reaktion der monomolekularen Reaktionsordnung folgt, ja, es wird sogar gefunden, daß bei der „Licht"-Reaktion die Konstanten viel weniger abnehmen, als bei der normalen oder „Dunkel"-Reaktion. Über die Ursache dieser Erscheinung werden theoretische Erwägungen angestellt. Der Einfluß der Wellenlänge ist derselbe wie bei den Versuchen der Gruppe A: Die hemmende Wirkung des Lichts nimmt ab in der Reihenfolge: Hell > Violett > Gelb > Dunkel. — Die Versuche wurden angestellt mit Extrakten aus lebenden Dytiscus, Hydrophilus, Porthesia-Räupchen und mit Extrakten aus getrockneten Porthesia-Räupchen.

Es ist vielleicht zweckmäßig, schon hier darauf hinzuweisen, daß die Versuche der Gruppe B insofern für die biologischen Verhältnisse von Interesse sind, als ja auch entsprechende hypothetische Katalasewirkungen selbst im lebenden Organismus häufiger Lichteinflüssen ausgesetzt sein werden als untätige Katalaselösungen, wie sie bei den Versuchen der Gruppe A studiert wurden. Bei Veränderungen des Katalasengehaltes durch Belichtung lebender Tiere werden aller Voraussicht nach etwaige Unterschiede den Wirkungen der Bestrahlung auf die katalytischen Peroxydzersetzungen selbst resp. erst den Resultaten dieser Beeinflussung zuzuschreiben sein.

C. Versuche über den Einfluß der Belichtung auf den Katalasengehalt lebender Tiere.

§ 16. In diesem Abschnitt soll eine Anzahl von Versuchen beschrieben werden, welche vielleicht das nächste biologische Interesse besitzen. Es handelt sich dabei um die Frage, ob auch im lebenden Organismus photochemische Vorgänge stattfinden, welche zu einer Veränderung des Katalasengehaltes in den Geweben des lebenden Organismus selbst führen. Es könnte ja sein, daß die in den vorigen zwei Abschnitten beschriebenen Lichtwirkungen nur auf das Verhalten der Fermentextrakte beschränkt sind und darum für eine Theorie des Phototropismus nicht oder nur in entfernteren Beziehungen in Frage kämen.

Die allgemeine Methode, welche ich, um zur Lösung dieser Frage beizutragen, einschlug, war die, daß ich eine größere

Anzahl möglichst gleichartiger, unter gleichen Umständen usw. gehaltener „Normal"-Tiere verschiedenen Belichtungsbedingungen aussetzte, sowie nach einiger Zeit „Normal"-Extrakte, d. h. Extrakte mit konstantem Verhältnis von Tiersubstanz zu Chloroformwasser herstellte und diese auf ihren Katalasengehalt untersuchte. Um dies Verfahren berechtigt anwenden zu können, mußte das Material erstens sehr gleichartig sein, zweitens sich leicht dosieren lassen und drittens bei der Herstellung von Extrakten, falls das Material unter gleichen Bedingungen gehalten war, konstante Fermentkonzentrationen resp. Geschwindigkeitskonstanten ergeben. Allen diesen Anforderungen genügen nun in ganz ausgezeichneter Weise die jungen in Nestern überwinternden Räupchen von Porthesia chrystorrhoea. So befinden sich in einem Neste, d. h. in der Regel in einem Gelege meist mehrere Hundert Räupchen, welche untereinander wohl so gleichartig beschaffen sind, wie dies bei physiologischem Material möglich ist. Eine Dosierung läßt sich leicht dadurch vornehmen, daß man aus demselben Neste die gleiche Zahl von Räupchen in die verschiedenen Versuchsgefäße bringt resp. nach den Belichtungsversuchen mit einem konstanten Volum Chloroformwasser verreibt. In der Regel wurden „Normal"-Extrakte, d. h. ein Räupchen auf 1 ccm Chloroformwasser, angefertigt. — Die im folgenden beschriebenen Versuche sind alle mit Porthesia-Räupchen angestellt worden, da ich ein besseres Material nicht finden konnte. Neben den genannten Vorzügen sei noch angeführt, erstens der Umstand, daß die überwinternden, kühl und dunkel aufbewahrten Räupchen ganz außerordentlich reich an Katalase sind, sowie zweitens die Tatsache, daß die durch Zerreiben der Dunkel-Räupchen hergestellten filtrierten Lösungen kaum eine Guajacperoxydasenreaktion geben, also natürliche relativ reine Katalasenlösungen darstellen. Auf den zweiten Umstand wird weiter unten eingegangen werden. Endlich sei auch noch erwähnt, daß die „Normal"-Extrakte gut filtriert sehr arm an organischen Stoffen sind, so daß der geringe additive Titrationsfehler in der Regel nicht mehr als 0.1 bis 0.2 ccm betrug.

Schon ein erster orientierender Versuch zeigte zwischen dem Katalasengehalt der im Dunkeln und der im Hellen gehaltenen Räupchen einen sehr beträchtlichen Unterschied.

Versuch 25 (III. 29). Es wurden mehrere Porthesia-Nester von demselben Baum (Birne, Ende Februar) abgebrochen, in eine große Blechschachtel gelegt und dieselbe im dunkeln und kühlen Keller (ca. 6 bis 8°) aufbewahrt. Eins dieser Nester wurde im März auf eine Glasplatte gelegt, ein Glastrichter darüber gestellt, durch das Rohr derselben ein Holzstäbchen gesteckt, welches das Nest berührte, im Trichterrohr dagegen lose anlag und dasselbe überragte, ein Reagensröhrchen über das Holzstäbchen und das Trichterrohr gehängt und schließlich das Ganze an der Südseite eines Zimmers in die Sonne gestellt. Das beschriebene Verfahren eignet sich vortrefflich zur Erzielung einer „Reinkultur" der Räupchen, die, einmal aus dem Neste gekrochen, infolge ihres energischen negativen Geotropismus sich an der Kuppe des Reagensröhrchen nach und nach zu einem dicken Klumpen ansammeln. Charakteristisch ist, daß zunächst bei geringerer Zahl der Räupchen die Kuppe des Rohres sehr gleichmäßig, an der Fensterseite beginnend, bedecken, indem zunächst jedes Räupchen seine Ventralseite dem Lichte zukehrt. Es erinnert dies Verhalten lebhaft an das der Fliegenmaden gegenüber dem Licht, wie es von Loeb in seiner bekannten ersten Abhandlung beschrieben hat. Kommen mehr Räupchen nach oben, so rücken dieselben immer dichter zusammen und bedecken in einschichtiger Lage auch die andern Seiten der Kuppe. Späterhin, bei einer noch größeren Zahl der Räupchen, scheint der negative Geotropismus den positiven Phototropismus zu überwinden, indem nämlich die Räupchen übereinander kriechen und ganz oben im Röhrchen einen dichten Klumpen bilden, der sich bei einigem Schütteln glatt ablöst.[1])

Nach ca. $2^1/_2$ Tagen mit täglich fast 8 Stunden Sonne waren die meisten Räupchen oben im Reagensglas. Es wurden nun 20 dieser ausgekrochenen Räupchen mit 20 ccm Chloroformwasser zerrieben und zwei Stunden vor dem Filtrieren im Dunkeln stehengelassen. Ferner wurde eins der im Dunkeln und Kühlen gehaltenen Nester geöffnet und auch aus diesem 20 Räupchen entnommen, mit 20 ccm Chloroformwasser zerrieben und ebenfalls zwei Stunden stehengelassen. Bemerkenswerterweise zeigten bereits die unfiltrierten wie die filtrierten Extrakte äußerlich einen Unterschied, insofern als der „Hell"-Extrakt eine deutlich gelbere Färbung besaß als der „Dunkel"-Extrakt, welch letzterer einen violetten Ton besaß.[2]) Es sei anschließend bemerkt, daß die in den

---

[1]) Bei der Manipulation mit Porthesia-Räupchen ist einige Vorsicht geboten, da die sehr leicht abbrechenden, federartig gestalteten Härchen derselben empfindliches Jucken und ganz intensive Entzündungen auf der Haut verursachen. Ein Waschen der Hände mit verdünntem Peroxyd resp. ein Bestreichen der entzündeten Stellen mit konzentrierterem H_2O_2 scheint die Härchen am schnellsten zu zerstören.

[2]) Dieser Farbenunterschied war noch sehr deutlich zu bemerken, nachdem die beiden Extrakte zwei Tage lang in diffusem Lichte gestanden hatten.

vorigen Abschnitten untersuchten Extrakte von getrockneten Räupchen eine deutlich gelbe bis bräunliche Färbung (in konzentrierter Lösung) aufwiesen. — Es wurden nun je 10 ccm Extrakt mit je 100 ccm H_2O_2 gemischt und je 10 ccm titriert. Die Temperatur stieg während des Versuchs von 16.2 bis 17.0°.

Tabelle 20.

	Hell		Dunkel	
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Titer	.4343 K_H
0	25.0 (ber.)	—	25.0 (ber.)	—
10	21.7	.0062	21.1	.0074
20	19.2	57	17.8	74
30	16.3	61	14.6	78
40	14.2	61	12.1	79
50	12.4	59	10.0	80
60	10.5	63	8.0	82
70	9.1	63	6.8	81
80	7.9	63	5.6	83
90	6.9	62	4.8	80
100	6.0	61	4.0	80
	Mittel: .0061		Mittel: .0079	

$K_D : K_H = 1.3$.

Es ergibt sich also, daß die jungen Räupchen kurz nach dem Ausschlüpfen aus ihren Nestern in der Sonne merklich (ca. 23 %) an Katalase verlieren.

Auffällig ist wieder, daß bei den gleichzeitig und unter vollständig gleichen Bedingungen angestellten Versuchen die Konstanten des „Dunkel"-Versuches stärker während der Temperaturerhöhung von ca. 0.8°, welche während der Reaktion stattfand, steigen als die „Hell"-Konstanten.

Versuch 26 (III. 31). Zwei Tage später wurde derselbe Versuch wiederholt. Die ausgekrochenen Räupchen waren also 4 bis 5 Tage dem Licht (nicht immer der Sonne!) ausgesetzt gewesen. Versuchsbedingungen genau wie in Versuch 27. Es wurden je 150 ccm H_2O_2 mit 15 ccm Extrakt gemischt und immer 10 ccm titriert. Temperatur des Wasserbades schwankt nur wenig um 17.5°.

Tabelle 21.

	Hell		Dunkel	
Zeit in Min.	Titer	. 4343 K_H	Titer	. 4343 K_H
0	26.8 (ber.)	—	26.8 (ber.)	—
10	23.9	. 00497	21.6	. 00937
20	21.3	499	17.6	913
30	18.9	506	14.1	929
40	16.8	507	11.2	947
50	15.3	487	9.2	929
60	13.6	491	7.6	912
70	12.2	488	6.2	908
80	11.0	483	5.2	890
90	9.8	485	4.2	894
100	8.9	479	3.5	884
110	8.1	472	3.0	864
120	7.5	461	2.3	889
130	6.8	458	2.2	835
140	6.3	449	1.9	821

Mittel der „Hell"-Konstanten bis zu $^2/_3$ der Reaktion: **. 00492.**

Mittel der „Dunkel"-Konstanten bis zu $^2/_3$ der Reaktion: **. 00931.**

$$K_D : K_H = 1.93.$$

Der Versuch zeigt, daß nach weiteren zwei Tagen der Unterschied ganz beträchtlich zugenommen hat, so daß das Verhältnis der Fermentkonzentrationen in den „Hell"- und in den „Dunkel"-Räupchen fast wie 1 : 2 ist, resp. der anfängliche Gehalt durch die Belichtung um ca. $47\,^0/_0$ abgenommen hat. Die Konstanten sind in diesen zwei Versuchen wegen der größeren Konstanz der Versuchstemperatur sehr gut miteinander übereinstimmend; während des letzten Drittels der Reaktion zeigen beide Versuche das für längere Reaktionsdauer resp. die letzte Reaktionsstufe sowie für höhere Versuchstemperatur charakteristische Abfallen der Konstanten.[1]) — Die

[1]) Es sei hier noch ausdrücklich bemerkt, daß außer den hier geschilderten Versuchen noch eine ganze Anzahl gleichartiger angestellt wurden; immer wurde der bezeichnete Unterschied gefunden, wenn schon der Wert desselben schwankte.

„Dunkel"-Konstante ist in diesem Versuch etwas größer als in dem vorigen. Hierfür ist einerseits die etwas höhere Versuchstemperatur von Versuch 26, andererseits aber ein bemerkenswerter Umstand verantwortlich zu machen, über den weiter unten Näheres mitgeteilt werden wird.

§ 17. Es könnte nun trotzdem eingewendet werden, daß die bisher geschilderten zwei Versuche nicht ganz überzeugend sind, darum, weil Räupchen aus zwei verschiedenen Nestern in diesen Versuchen miteinander verglichen wurden. Diesem Einwand begegnet der folgende Versuch.

Versuch 27 (III. 33). Dasselbe Nest, aus welchem in Versuch 26 die „Dunkel"-Räupchen entnommen waren, wurde aus dem Dunkeln und Kühlen ins Licht und in eine Temperatur, die zwischen ca. 12° und 16° schwankte, gebracht. Das Nest stand eine Woche in diffusem Tageslicht und hatte nur zwei Tage schwache Sonne (April); die Räupchen begannen erst am dritten Tage auszukriechen. Versuchsanordnung genau wie in Versuch 25 und 26; 10 ccm Extrakt wurden mit 100 ccm H_2O_2 gemischt. Temperatur 16.5 bis 17.5°.

Tabelle 22.

Zeit in Min.	Titer	.4343 K
0	26.5 (ber.)	—
9	23.2	.0064
19	20.0	64
28	17.1	68
40	14.1	69
50	11.9	70
60	10.1	70

Wegen der geringen Temperaturerhöhung während des Versuchs steigen die Zahlen ein wenig. Nimmt man die höchste Konstante (.0070), welche bei einer dem Versuch 26 entsprechenden Temperatur erhalten wurde, zum Vergleich, so ergibt sich ein Sinken des Katalasengehaltes während einwöchiger diffuser Beleuchtung von .0093 auf .0070, d. h. eine Abnahme von ca. 25%. Man kann erstaunt sein, daß bei einer derartig langen Belichtung nur ein so geringer Unterschied beobachtet wurde, namentlich wenn man die vorangehenden Versuche in Betracht zieht. Indessen ist einmal zu

berücksichtigen, daß die Belichtung fast nur eine diffuse, relativ schwache war, sowie andererseits insbesondere daran zu denken, daß jedenfalls bei längerer Versuchsdauer und schwächerer Belichtung die Räupchen imstande sein werden, einen Teil der verloren gegangenen Katalase wieder neu zu bilden oder zu regenerieren. Obgleich eine derartige Fähigkeit von mir nur in einem Falle festgestellt worden ist (siehe später), hat die Annahme ihres Vorhandenseins nichts Unwahrscheinliches, namentlich wenn man auf Grund der fermentativen Theorie der physiologischen Verbrennung, die wenn auch nur vorübergehende Existenz von peroxydähnlichen Stoffen auch intra vitam annimmt. (Siehe übrigens später die Versuche über den Einfluß der Wellenlänge des Lichts.)

3. Schließlich könnte man noch daran denken, daß der Temperaturunterschied bei diesen Versuchen eine ausschlaggebende Rolle spielt, und daß diese die rasche Zerstörung der Katalase hervorruft. Es ist hierzu zu bemerken, daß unter den biologischen Verhältnissen, zu deren Analyse die vorliegenden Untersuchungen ja beitragen wollen, die Wirkung erhöhter Temperatur ebenfalls stets mit der Belichtung parallel geht. Daß auch die Temperatur eine hervorragende Rolle bei den phototropen Reaktionen des Porthesia-Räupchen spielt, geht ohne weiteres daraus hervor, daß die Räupchen im Winter trotz direkter Sonnenbestrahlung nicht aus ihren Nestern ausschlüpfen, dies jedoch tun, sobald sie Belichtung und erhöhter Temperatur ausgesetzt werden. Allerdings wirkt, wie schon oben bemerkt wurde, Temperaturerhöhung allein nur in geringem Maße. — Um jedoch auch dieser Möglichkeit Rechnung zu tragen, wurden Versuche mit der folgenden Anordnung angestellt.

Versuch 28 (III 39). Aus einem „Dunkel"-Neste wurden die Räupchen herausgenommen und zum Teil in ein helles, zum Teil in ein durch mehrfache Stanniolumwicklung verdunkeltes Röhrchen gegeben. Beide Röhrchen wurden mit einem Wattepfropf verschlossen, und in ein weites zweites Rohr, das mit Wasser gefüllt war, durch einen gelochten Korkstopfen hineingesteckt. Beide Röhren wurden unter ganz gleichen Bedingungen 2 Tage in die mittelstarke Sonne (April) gestellt. Es wurden „Normal"-Extrakte hergestellt und je 5 ccm Extrakt mit je 50 ccm H_2O_2 gemischt; je 10 ccm titriert. Temperatur 16.5°.

Tabelle 23.

Hell			Dunkel		
Zeit in Min.	Liter	.4343 K_H	Titer	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	26.5 (ber.)	—	26.5 (ber.)	—	—
10	23.2	.00578	22.7	.00672	1.16
25	19.4	542	18.4	634	1.15
41; 40	15.6	561	14.7	640	1.14
55	12.9	567	11.7	646	1.14
70	10.5	574	9.4	657	1.14
		Mittel: .00564		Mittel: .00650	

$K_D : K_H = 1.146$

Versuch 29 (III. 40). Dieselben Räupchen wurden nach weiteren 28 Stunden, von welchen ca. 6 starke Sonne waren, bei ganz gleicher Versuchsanordnung untersucht. Je 50 ccm H_2O_2 + 5 ccm Extrakt; je 10 ccm titriert. Temperatur 17.2 bis 17.5°.

Tabelle 24.

Hell			Dunkel		
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Titer	.4343 K_D	$K_D : K_H$
0	26.5 (ber.)	—	26.5 (ber.)	—	—
10	23.2	.00423	21.3	.00632	1.49
30	19.8	423	17.3	617	1.46
45	17.0	428	13.9	623	1.45
60	14.5	436	10.9	643	1.47
75'	12.5	435	8.7	645	1.48
		Mittel: .00429		Mittel: .00632	

$K_D : K_H = 1.47$

Aus Versuch 28 und 29 geht mit aller Deutlichkeit hervor, daß die erhöhte Temperatur nicht die Ursache für die Zerstörung der Katalase innerhalb des lebenden Tierkörpers ist, vielmehr die Belichtung. Weiterhin zeigen die Versuche, daß das Verhältnis $K_D : K_H$ innerhalb 28 Stunden (bei zirka 6 Stunden direkter Sonne) von **1.15** bis auf **1.47** steigen kann. Interessant ist es auch festzustellen, daß zwar auch die „Dunkel"-Räupchen einen kleinen Verlust an Katalase, erlitten, daß aber dieser Verlust, wie aus den Zahlen .00650 und .00632 hervorgeht, im Vergleich zu den sonst beobachteten Unterschieden sehr klein (2.8%) ist.

§ 18. Dieser bemerkenswerte Umstand, daß der Katalasengehalt des lebenden Räupchen im Dunkeln (aber bei erhöhter Temperatur) auch nach längerer Versuchsdauer nur eine sehr schwache Abnahme resp., wie aus Versuch 25 und 26 hervorgeht, beim Aufbewahren der Räupchen bei 8 bis 10° sogar eine kleine Zunahme erfährt, führte zu folgender Überlegung. Es erschien nicht ausgeschlossen, daß im Dunkeln bei höherer Temperatur, bei kürzeren Versuchszeiten gar keine Abnahme, sondern im Gegenteil durch die gesteigerte physiologische Tätigkeit eine Zunahme des Katalasengehaltes stattfindet. Besondere Versuche zur Feststellung dieses Verhaltens bestätigten nun durchaus diesen Schluß.

Zunächst stellte es sich heraus, daß bereits bei einer Temperatur von 8 bis 10° im Dunkeln eine allmähliche Steigerung des Katalasengehalts stattfindet.

Versuch 30 (III. 41 und 44). Aus einem im Keller aufbewahrten Dunkelnest wurden einige Räupchen entnommen, welche aber (Ende April) bereits aus dem Neste hervorgekrochen waren und auf ihm saßen, ein „Normal"-Extrakt hergestellt und untersucht. Das Nest wurde unter den gleichen Bedingungen belassen, ca. 30 Stunden wieder einige Räupchen entnommen, ein „Normal"-Extrakt hergestellt und wiederum untersucht. Je 5 ccm Extrakt wurden mit je 50 ccm H_2O_2 gemischt; je 10 ccm wurden titiert.

Tabelle 25.

I Temp. 17.4°			II Temp. 16.8° (nach 30 Std.)		
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_I	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_{II}
0	27.5 (ber.)	—	0	27.4 (ber.)	—
15	22.8	.00543	14	22.9	,00552
30	18.9	543	30	18.8	545
45	15.6	547	45	15.1	575
60	13.1	537	60	12.4	574
75	11.1	525	75	10.5	555
	Mittel: .00539			Mittel: .00560	

Wenn schon der beobachtete Unterschied nicht groß ist, so ist er doch zweifellos größer als die möglichen Fehler, einerseits wegen der Regelmäßigkeit der Konstanten, andrerseits wegen der etwas niedrigeren Versuchstemperatur von Versuch II, welche den Wert der K_{II} außerdem etwas verringert.

Am besten wird dies langsame Ansteigen des Katalasen-

gehaltes der Räupchen bei 8—10° jedoch veranschaulicht durch eine chronologische Zusammenstellung der Konstanten von „Normal"-Extrakten, welche zu den verschiedensten Versuchszwecken während der Monate März—April gemessen wurden.

Tabelle 26.

Temperatur während der Reaktion	H_2O_2-Konzentration des Reaktionsgemisches in ccm $KMnO_4$	K_D
16.2—17.0°	25.0	.0079
17.5	26.8	.0093
17.5	27.1	.0102
17.4	27.5	.0054
16.8	27.4	.0056
17.0	27.4	.0068

Die ersten drei Messungen wurden in den ersten 14 Tagen nach der Einbringung der Nester angestellt; sie zeigen ein stetiges Wachsen der Konstante. Die letzten drei Messungen fanden nach einer ca. 10tägigen Pause statt, die sind beträchtlich kleiner geworden. Dies letztere Verhalten ist nun bei längerer Gefangenschaft das allgemeine, insofern als der Katalasengehalt gleichsinnig mit den physiologischen Funktionen der Räupchen abzunehmen scheint; nach ca. 4 Wochen unter den genannten Bedingungen beginnen die Räupchen (jedenfalls aus Nahrungsmangel) einzugehen. Man findet dann Konstanten, die nur wenig den Wert .0030 überschreiten.

§ 19. Bei Versuchen mit höherer Temperatur ergibt sich entsprechend dem oben Gesagten eine anfängliche Zunahme des Katalasengehaltes in den ersten Tagen, eine deutliche Abnahme bei längerer Versuchsdauer.

Versuch 31 (III. 46, 47 b, 48 b, 51 b). Eine größere Anzahl „Dunkel"-Räupchen wurde zwecks Untersuchung des Einflusses der Wellenlänge des Lichts in entsprechende Versuchsgläser (siehe die obenstehende Beschreibung), darunter auch in ein dicht mit Stanniol umwickeltes Rohr gebracht und belichtet. Die Temperatur schwankte während dieser Belichtung zwischen ca. 15 bis 19°. Es wurden nun „Normal"-Extrakte hergestellt und bei gleicher Versuchsanordnung bestimmt:

I. von den noch nicht höherer Temperatur ausgesetzten „Dunkel"-Räupchen;

II. nach 12stündigem Stehen bei höherer Temperatur;

III. nach im ganzen 36stündigem Stehen bei höherer Temperatur;

IV. nach insgesamt 96stündigem Stehen bei höherer Temperatur.

Tabelle 27.

I Temp. 17.0°			II Temp. 16.8 bis 17.0° nach 12 Std.		
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_I	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_{II}
0	27.4 (ber.)	—	0	27.4 (ber.)	—
14	22.1	.0067	15	21.1	.0076
30	17.5	65	35	15.2	73
45	13.6	68	55	10.6	77
60	10.5	69	75	7.3	77
75	8.2	70			
	Mittel:	.0068		Mittel:	.0076

III Temp. 16.8 bis 17.2° nach 36 Std.			IV Temp. 16.0 bis 16.8° nach 96 Std.		
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_{III}	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_{IV}
0	27.4 (ber.)	—	0	27.2 (ber.)	—
20	21.7	.0051	20	22.4	.0042
40	17.0	52	40	18.2	44
60	13.0	54	60	14.4	46
80	10.1	54	81	11.7	45
100	8.0	54	100	9.4	46
	Mittel:	.0053		Mittel:	.0045

Der Versuch zeigt, daß nach 12 Stunden eine deutliche Vermehrung, nach 36 Stunden dagegen schon eine entsprechende Verminderung des Katalasengehaltes eingetreten ist, welche nach 96 Stunden zu einem noch niedrigeren Gehalte führt. Bei erhöhter Temperatur (15 bis 19°) erfährt mit andern Worten der Katalasengehalt der lebenden Räupchen im Dunkeln genau dieselben Veränderungen wie bei niedrigerer Temperatur (8 bis 10°); nur findet der An- und Abstieg bei höherer Temperatur bedeutend früher statt als bei niederer. Diese Tatsachen stehen vollkommen im Einklang mit der Annahme, daß durch die physiologische Tätigkeit der Räupchen sowohl der Katalasengehalt erhöht werden kann, als auch damit, daß dieser Prozeß durch Temperaturerhöhung beschleunigt wird. Gleichzeitig aber erfährt bei höherer Temperatur auch ein die Katalase zerstörender Prozeß eine Beschleunigung, so daß hier auch die schließliche Abnahme des Katalasengehaltes früher erfolgt als bei niederer Temperatur.

§ 20. Beim Studium des Einflusses der Wellenlänge des Lichts auf den Katalasengehalt der lebenden Räupchen erhielt

ich ziemlich komplizierte Resultate. Die Versuchstechnik war genau die in den vorigen zwei Abschnitten beschriebene, nur wurden statt der Lösungen lebende „Dunkel"-Räupchen in die inneren Reagensröhren gebracht, sowie die letzteren mit Watte verschlossen. Zunächst seien drei Versuche beschrieben, welche mit Räupchen angestellt wurden, die relativ kurze Zeit hinter den Farbfiltern gewesen und noch sämtlich lebendig waren.

Versuch 32 (III. 47). Die Räupchen eines Dunkelnestes wurden in 4 Versuchsgläsern, welche entsprechend der obigen Beschreibung vorgerichtet waren, verteilt und 10 Stunden lang schwacher Sonne (April) ausgesetzt. Es wurden „Normal"-Extrakte hergestellt, je 5 ccm Extrakt mit 50 ccm H_2O_2 gemischt und immer 10 ccm titriert. Temperatur 16.8 bis 17.0°.

Tabelle 28.

	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Titer	.4343 K_D	Titer	.4343 K_G	Titer	.4343 K_V
0	27.4(ber.)	—	27.4(ber.)	—	27.4(ber.)	—	27.4(ber.)	—
15	22.9	.00519	21.1	.00756	20.4	.00854	22.4	.00583
35	18.1	514	15.2	731	14.5	818	17.7	542
55	14.3	512	10.6	767	9.9	804	13.1	547
75	11.0	528	7.3	766	7.0	790	10.8	539
	Mittel:	.00518	Mittel:	.00755	Mittel:	.00817	Mittel:	.00543

$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.63 : 0.92 : 1 : 0.66$

Versuch 33 (III. 48). Ein Teil derselben Räupchen, von denen einige in Versuch 32 untersucht wurden, blieben weitere 24 Stunden dem Licht ausgesetzt; sie erhielten dabei ca. 4 Stunden ziemlich kräftige Sonne (April). Versuchsanordnung dieselbe wie in Versuch 30. Temperatur 16.8 bis 17.2°.

Tabelle 29.

	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Titer	.4343 K_D	Titer	.4343 K_G	Titer	.4343 K_V
0	27.4(ber.)	—	27.4(ber.)	—	27.4(ber.)	—	27.4(ber.)	—
20	23.5	.00333	21.7	.00507	21.3	.00547	22.1	.00467
40	20.1	338	17.0	518	16.3	564	17.9	482
60[1])	17.6	326	13.0	539	12.3	579	13.9	490
80	14.4	349	10.1	542	9.3	587	11.5	471
100	12.0	359	8.0	535	7.4	569	9.4	465
	Mittel:	.00341	Mittel:	.00528	Mittel:	.00569	Mittel:	.00475

$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.60 : 0.93 : 1 : 0.82$

[1]) Beim „Hell"-Versuch wurde bereits nach 59 Minuten titriert.

Versuch 34 (III. 51). Dieselben Räupchen, von denen in Versuch 32 und 33 einige in bezug auf ihren Katalasengehalt untersucht wurden, wurden weitere 62 Stunden dem Lichte ausgesetzt, so daß sie insgesamt 96 Stunden (4 Tage) belichtet gewesen waren. Im Gegensatz indessen zu den ersten 34 Stunden erhielten die Räupchen während der letzten 62 Stunden keinen Tag direkte Sonne, waren vielmehr nur diffusem Licht von meist stark bewölktem Himmel (meist Regen, April) ausgesetzt. Versuchsanordnung die gleiche wie in vorigen Versuchen. Temperatur 16.0 bis ca. 16.8°.

Tabelle 30.

Hell			Dunkel		
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_D
0	27.2 (ber.)	—	0	27.2 (ber.)	—
19	22.9	.0040	20	22.4	.0042
40	18.7	41	40	18.2	44
60	15.2	42	60	14.4	46
80	12.1	44	81	11.7	45
101	9.7	44	100	9.4	46
	Mittel:	.0042		Mittel:	.0045

Gelb			Violett		
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_G	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_V
0	27.2 (ber.)	—	0	27.2 (ber.)	—
19	22.4	.0044	20	22.9	.0037
40	17.7	47	40	19.3	37
60	13.4	51	60	15.8	39
81	10.4	52	80	13.4	38
100	9.0	48	100	11.0	39
	Mittel:	.0048		Mittel:	.0038

$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.88 : 0.94 : 1 : 0.79$

Diese Versuche (32, 33 und 34) zeigen nun folgende interessante Resultate.

Zunächst fällt in allen drei Versuchen auf, daß die beste Konservierung der Katalase nicht im Dunkeln, sondern im gelben Lichte stattfand, im Gegensatz zu dem Verhalten der Fermentlösungen und der Reaktionsgemische, welche in den vorigen zwei Abschnitten untersucht wurden, und die im Dunkeln am wenigsten geschädigt wurden. Es ist nun zunächst daran zu denken, daß möglicherweise irgend eine Undichtigkeit in der Stanniolumhüllung hierfür verantwortlich zu machen

ist. Indessen wurde das besagte Verhalten bei allen diesbezüglichen Versuchen (soweit es sich um lebende Tiere handelt) und bei sorgfältigster und ca. 20facher, mit Gummi verklebter Stanniolumhüllung wiedergefunden. Dieselben Umhüllungen, ja sogar solche aus weniger Schichten Stanniol, gaben bei den Versuchen mit Fermentextrakten und Reaktionsgemischen die entgegengesetzten Resultate. Es bleibt daher nichts anderes übrig, als die Richtigkeit des genannten Resultates anzunehmen.

Was das Verhältnis $K_G : K_H$ anbetrifft, so ist dasselbe 0.92, 0.93, 0.94; d. h. es nähert sich im Laufe des Versuchs stetig 1. Wir werden später sehen, daß bei noch längerer Versuchsdauer es gleich 1 werden und sich damit den an Fermentextrakten und Reaktionsgemischen gemachten Erfahrungen nähern kann.

Endlich sei noch besonders betont, daß auch im gelben Lichte, und zwar in noch größerem Umfang als im Dunkeln, eine anfängliche Steigerung des Katalasengehaltes stattfindet. Es scheint so, als wenn wir es in der Tat hier mit einer Reaktion zu tun haben, welche von Strahlen kürzerer Wellenlänge beschleunigt, von solchen größerer Wellenlänge aber verzögert wird (siehe die Diskussion über die „Violett"-Versuche), in ähnlicher Weise, wie es von Trautz und Thomas für eine große Anzahl gewöhnlicher chemischer Reaktionen gefunden worden ist.

Der Wert der „Dunkel"-Konstanten nimmt bei den hier geschilderten Versuchen bereits stetig ab. Hinzu gehört indessen der in Tabelle 27 unter I angeführte Versuch, welcher das Anwachsen der Konstante innerhalb der ersten zehn Stunden zeigt.

Bemerkenswert ist auch das Verhalten der „Hell"-Konstanten. Während der ersten 10 Stunden (verglichen mit der anfänglichen „Dunkel"-Konstante I, Tabelle 27) sowie auch während der ersten 34 Stunden direkter Sonnenbelichtung nimmt dieselbe deutlich ab, wie dies bereits schon früher geschildert worden ist. Während weiterer 62 Stunden aber waren die Räupchen nur schwachem diffusem Himmelslicht, unter Herabsetzung jedenfalls auch der Temperatur, um schätzungsweise 3 bis 4° (eine spezielle Messung habe ich leider versäumt) aus-

gesetzt gewesen, mit dem Resultate, daß die Konstante resp. der Katalasengehalt sich erhöhte. Ich möchte nicht zu bemerken unterlassen, daß ich nur über diese eine Beobachtung verfüge, und eine weitere Prüfung der Annahme, ob tatsächlich auch im diffusen schwachen Lichte ebenfalls eine Vermehrung resp. Regeneration der Katalase, wie sie sicher im Dunkeln stattfindet, möglich ist, für notwendig halte. Indessen sprechen mehrere Punkte zugunsten der Allgemeingültigkeit dieses einen Resultates.

Zunächst habe ich mehrere Male die Erfahrung gemacht, daß sowohl Räupchen bei ungefähr gleicher Temperatur im diffusen Licht länger am Leben blieben, als auch nach kürzerer intensiver Sonnenbestrahlung (bei welcher die Räupchen bald fast unbeweglich werden) sich erholten, wenn sie wieder ins Dunkle oder in diffuses Tageslicht gestellt wurden. Die hierdurch hervorgebrachte Steigerung der allgemeinen physiologischen Tätigkeit macht auch die Fähigkeit einer Regeneration der durch intensivere Belichtung zerstörten Katalase wahrscheinlich.

Ferner aber spricht sowohl das Verhalten der Räupchen im violetten als auch im gelben Lichte für eine Regenerationsfähigkeit der Katalase unter dem Einfluß des gemischten Lichtes. Die „Violett"-Konstanten zeigen in Tabelle 28 bis 30 zunächst eine stetige aber relativ kleine, dann aber, nach längerer Zeit eine ganz außerordentlich starke Abnahme, während gleichzeitig die „Hell"-Konstante steigt. Auf der andern Seite wurde schon betont, daß im gelben Lichte anfangs eine ganz bedeutende Vermehrung des Katalasengehaltes auftritt, und daß durchweg in allen Versuchen, bei welchen lebende Räupchen untersucht wurden, die Konstanten höhere Werte im gelben Lichte als im Dunkeln aufweisen. Dies zweifache Verhalten legt nun den Gedanken nahe, daß bereits die im gemischten oder weißen Licht enthaltenen gelben und roten Strahlen genügen, um bei geringer Lichtintensität eine Vermehrung oder Regeneration der Katalase zu bewirken. Es muß auch daran erinnert werden, daß bei trübem, regnerischem Wetter (wie es während der letzten 62 Stunden des Versuches herrschte), durch den in der Luft enthaltenen Wasserdampf insbesondere auch die violetten resp. ultravioletten Strahlen absorbiert wer-

den, so daß von vornherein ein Licht mit einem größeren Prozentsatz roter und gelber Strahlen zur Verwendung kam.

Alle diese Punkte sprechen zugunsten der Annahme, daß eine Vermehrung der Katalase auch durch schwache diffuse Belichtung der Räupchen auf Grund der beschleunigenden Wirkung der im gemischten Lichte enthaltenen gelben und roten strahlen möglich ist.

§ 21. Dehnt man die Versuche noch weiter aus, so fangen die Räupchen an einzugehen. Gleichzeitig werden die in ihnen enthaltenen Katalasenmengen in recht komplizierter Weise verändert. Es ist zunächst von Interesse festzustellen, in welcher Reihenfolge die Räupchen absterben. In zwei ausgedehnteren diesbezüglichen Versuchen fand ich beide Male dieselbe Reihenfolge: Zuerst starben die Räupchen im farbigen Lichte, und zwar am schnellsten im gelben, dann im violetten. Es folgten darauf die im Dunkeln gehaltenen Räupchen, während die dem gemischten Lichte ausgesetzten stets am längsten lebendig blieben. Es ist dieser letztere Punkt von besonderer Wichtigkeit für die biologische Theorie des Phototropismus, indem er nämlich zeigt, daß die normale positiv phototrope Reaktion, welche zu einer Belichtung der Räupchen führt, in der Tat ein lebenserhaltender Vorgang ist.

Vergleicht man nun den Katalasengehalt sterbender oder bereits abgestorbener Räupchen, so erhält man folgende Ergebnisse.

Zunächst muß darauf hingewiesen werden, daß bereits in Versuch 34 (Tabelle 30) unter dem gelben und violetten Lichte einige Räupchen abgestorben waren, mehr dabei unter dem ersteren als unter dem zweiten. Untersucht wurden indessen nur lebende Räupchen. Indessen zeigt bereits dieser Versuch zwei Erscheinungen, welche für die Variation des Katalasengehaltes absterbender Räupchen charakteristisch sind: Die „Gelb"-Konstante nähert sich immer mehr der „Dunkel"-Konstanten resp. nimmt schneller als diese ab; die „Violett"-Konstante sinkt rapid unter den Wert der „Hell"-Konstanten. Bei einem andern, von Versuch 32—34 unabhängigen Versuch, bei welchem die Räupchen ca. fünf Tage belichtet gewesen waren, und im gelben Versuchsgefäß bereits einige tote Räupchen gefunden

wurden, erhielt ich von lebenden Räupchen folgende Konstanten. Versuch 35 (III. 45).

Tabelle 31. (Versuch 35. III, 45.)

Temp. 17.6°	Hell		Temp. 17.6°	Dunkel	
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_D
0	27.6 (ber.)	—	0	27.6 (ber.)	—
15	22.0	.0066	15	21.5	.0072
30	17.3	68	30	16.6	74
45	13.5	69	45	12.7	75
60	10.8	68	60	10.0	74
75	8.8	66	75	8.4	69
	Mittel: .0067			Mittel: .0073	

Temp. 17.6°	Gelb		Temp. 17.6°	Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_G	Zeit in Min.	Titer	.4343 K_V
0	27.6 (ber.)	—	0	27.6 (ber.)	—
14	21.8	.0072	14	22.7	.0061
30	—	—	30	—	—
45	13.0	.0073	45	14.7	.0061
60	10.0	74	60	12.0	60
75	—	—	75	—	—
	Mittel: .0073			Mittel: .0061	

$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.92 : 1 : 1 : 0.83$

Tabelle 31 (Versuch 35, III. 45) zeigt, daß das in Versuch 34 (Tabelle 30) gefundene Verhalten allgemeingültig zu sein scheint. Denn auch in diesem zweiten Versuche kommen sich die „Dunkel"- und „Gelb"-Konstante so nahe, daß sie sogar denselben Zahlenwert besitzen. Andererseits ist aber auch das charakteristische und nur bei längerer Versuchsdauer zu beobachtende Verhalten der „Violett"-Konstanten wiederzufinden: sie sinkt deutlich, wenn auch nicht so stark wie in Versuch 34 unter den Wert der „Hell"-Konstanten.

Wartet man endlich so lange, bis die Räupchen in farbigen Versuchsgefäßen vollständig, im Dunkeln zum Teil abgestorben sind, so erhält man, wenn man „Normal"-Extrakte der toten Räupchen im Gelb und Violett, der noch lebenden im Dunkeln und Hellen untersucht, folgende Resultate.

Versuch 36 (III. 35). Die Räupchen eines „Dunkel"-Nestes wurden in 4 entsprechend vorgerichtete Versuchsgefäße verteilt und in die Sonne gestellt. Sie wurden sechs Tage lang ziemlich kräftig belichtet. Am fünften Tage war über die Hälfte der Räupchen im gelben Licht gestorben; die übrigen verendeten während des sechsten Tages. Im violetten Licht waren am fünften Tage nur sehr wenige (vielleicht 3 unter 50), am sechsten jedoch alle gestorben. Die im Dunkeln und im gemischten Licht aufbewahrten waren am fünften Tag noch sämtlich lebendig; am sechsten starben etwa 6 unter ca. 50 Räupchen im Dunkeln. Es wurden in beschriebener Weise „Normal"-Extrakte hergestellt und wie gewöhnlich untersucht. Temperatur 17.5 bis 17.8.

Tabelle 32.

	Hell		Dunkel		Gelb		Violett	
Zeit in Min.	Titer	.4343 K_H	Titer	.4343 K_D	Titer	.4343 K_G	Titer	.4343 K_V
0	27.1 (ber.)	—	27.1 (ber-)	—	27.1 (ber.)	—	27.1 (ber.)	—
15	21.4	.00684	20.9	.00752	24.0	.00352	23.3	.00437
30	16.8	692	16.0	763	21.5	335	20.5	404
45	13.1	702	12.2	770	19.3	394	17.8	406
60	10.8	666	9.5	759	17.5	316	15.6	400
75	8.2	692	7.5	744	15.9	309	13.8	391
	Mittel: .00687		Mittel: .00758		Mittel: .00341		Mittel: .00408	

$K_H : K_D : K_G : K_V = 0.96 : 1 : 0.41 : 0.52$

Die Resultate dieses Versuches haben nur einen bedingten Wert, einmal weil der Katalasengehalt toter und lebender Räupchen miteinander verglichen wurde, andererseits darum, weil die Räupchen im gelben Lichte eher starben als die im violetten und darum als Kadaver längere Zeit der zerstörenden Lichtwirkung ausgesetzt waren, Die gewaltige Abnahme des Katalasengehaltes in toten belichteten Räupchen beruht wohl zweifellos zum Teil auf dem Umstande, daß die physiologische Tätigkeit im Sinne einer Neuproduktion des Ferments in Wegfall kommt. In demselben Sinne wird auch das Sinken der „Gelb"-Konstante unter den Wert aller übrigen Konstanten, ein Verhalten, das sonst in keinem einzigen Versuche beobachtet wurde, auf diesen Umstand zurückzuführen sein.

Interessant ist indessen, daß auch bei einer so großen Versuchsdauer der Sinn des Unterschiedes zwischen „Hell" und „Dunkel" derselbe bleibt, obschon die Zahlen sich sehr nahe kommen.

§ 29. Fragt man nun nach den Beziehungen zwischen dem Katalasengehalt und der Verderblichkeit des Lichtes, so kommen für eine derartige Verknüpfung naturgemäß nur Versuche in Betracht, welche an noch lebenden Räupchen angestellt wurden, d. h. Versuch 34 und 35 (Tabelle 30 und 31). Es ergibt sich sodann die bemerkenswerte Tatsache, daß die Räupchen mit dem größten Katalasengehalt (die unter dem gelben Licht gehaltenen) am ehesten sterben. Dieses Ergebnis ist ein durchaus regelmäßiges und sicheres. Weiterhin verwickeln sich die Verhältnisse, insofern als nicht die im Dunkeln gehaltenen Räupchen, welche den zweitgrößten Katalasengehalt, sondern die dem violetten Licht ausgesetzten, welche in den späteren Versuchsstadien den kleinsten Katalasengehalt besitzen, zu zweit umkommen. Zuletzt sterben im gemischten Lichte die Räupchen mit einem Katalasengehalt, der zwar ebenfalls sehr klein, nach den Versuchen indessen in späteren Stadien stets größer als der der „Violett"-Räupchen ist. Würde also die Sterblichkeit ohne weitere Komplikationen parallel mit dem Gehalte an Katalase gehen, so sollte der Sterblichkeitsreihe gelb > violett > dunkel > hell eine gleichsinnige Abnahme des Katalasengehaltes entsprechen. Statt dessen finden wir den Katalasengehalt in der Reihe gelb > dunkel > hell > violett abnehmen, oder es sterben die Räupchen mit dem größten und mit dem kleinsten Katalasengehalt zuerst, während die Sterblichkeit im Dunkeln und Hellen wieder parallel mit dem Katalasengehalt verläuft.

Die wahrscheinlichste Erklärung erscheint mir die folgende: Die Zerstörung der Katalase, die in der Reihenfolge gelb < dunkel < hell parallel mit der Sterblichkeit läuft, ist nur bis zu einem bestimmten Grade der Verminderung ein lebenserhaltender Vorgang. Wird die Katalase in einem zu großen Maße vernichtet, wie dies ein längeres Verweilen in violettem Lichte mit sich bringt, so sinkt der Katalasengehalt unter das Minimum, welches zur Erhaltung der physiologischen Funktionen, insbesondere der oxydativen Vorgänge, an welchen die Katalase beteiligt ist, nötig ist, und die anfangs lebenserhaltende Reduktion derselben wird zu einem schädlichen Vorgang. Man braucht zur Begründung dieser Erklärung durchaus nicht weit auszuholen. Die oft gefundene und wahrscheinlich

gesetzmäßige Umkehrung der phototropen Reaktion vieler Organismen bei zu starker Belichtung sowie die hier beschriebene Tatsache, daß auch im gemischten Lichte bei längerer Einwirkung die Räupchen unter einem starken Katalasenverluste sterben, rechtfertigt diese Erklärung. Warum die Zerstörung gerade im violetten Licht bei längerer Versuchsdauer eine so intensive ist, wurde schon weiter oben erörtert. Sehr wahrscheinlich beruht sie auf der Notwendigkeit der gelben Strahlen für eine physiologische Neubildung der Katalase resp. auf der Unmöglichkeit der Räupchen, im violetten Lichte die zerstörte Katalase wenigstens teilweise wieder zu regenerieren. Dies wird dadurch sehr nahegelegt, daß bei allen Belichtungsbedingungen außer im violetten Lichte, ja sogar bei schwachem gemischtem Licht bei höherer Temperatur eine anfängliche Vermehrung der Katalase eintritt, die am stärksten im gelben Lichte, schwächer im Dunkeln und am geringfügigsten im schwachen gemischten Lichte ist.

Diese Versuche führen zusammengefaßt zu folgenden Sätzen. Die Sterblichkeit der Porthesia-Räupchen bei wechselnden Belichtungsbedingungen, insbesondere mit Berücksichtigung des Einflusses von Licht verschiedener Wellenlänge geht zunächst parallel mit dem Katalasengehalt, insofern als der Sterblichkeitsreihe gelb > dunkel > hell eine Reihe des Katalasengehaltes gelb > dunkel > hell entspricht. Geht die Zerstörung der Katalase zu weit, wie dies im violetten Lichte bei längerer Versuchsdauer geschieht, so wird ebenfalls eine starke Schädigung hervorgerufen, welche also aus den entgegengesetzten Gründen stattfindet. Dies letztere entspricht dem biologischen Verhalten vieler positiv phototroper Organismen, insofern als bei zu intensiver Beleuchtung (entsprechend zu intensiver Zerstörung der Katalase) der Sinn der tropischen Reaktion sich umkehrt.

§ 23. Zum Schlusse dieses Teils möchte ich noch einige Beobachtungen mitteilen, welche zwar nicht auf den Katalasengehalt der Räupchen Bezug haben, wohl aber sonst von einigem Interesse sind.

Es wurde schon oben erwähnt, daß der aus „Dunkel"-Raupen hergestellte „Normal"-Extrakt im allgemeinen eine mehr violettbräunliche Farbe hat, im Gegensatz zu den aus beichteten Räupchen hergestellten Fermentlösungen, welche mehr

gelblichbraun waren. Dieser Unterschied wurde nun durchgängig bei allen in Betracht kommenden Extrakten wiedergefunden, und es ist nach ein wenig Übung leicht, zwei derartige Extrakte bereits an ihrer Färbung zu unterscheiden.

In entsprechender Weise machen sich auch Unterschiede bei Extrakten geltend, welche aus Räupchen hergestellt wurden, die farbigem Lichte ausgesetzt gewesen waren. So finden sich in meinen Versuchsnotizen für die Färbungen der in Versuch 36 (Tabelle 32) untersuchten Extrakte folgende Bezeichnungen: Gelb-E.: intensiv gelblich, Violett-E.: weniger gelblich, dann folgen in bezug auf Gelb: Dunkel > Hell. Zwischen Dunkel und Hell wenig Unterschied. Vergleicht man diese Reihenfolge: gelb > violett > dunkel > hell mit der Reihenfolge des Katalasengehalts: dunkel > hell > violett > gelb, so findet man, abgesehen von der Stellung des „dunkel" genau die entgegengesetzte Ordnung. Sehen wir von dem Farbenunterschied zwischen hell und dunkel, der ausdrücklich als „wenig" bezeichnet wurde, ab, so ergibt sich, daß die Extrakte um so gelblicher sind, je weniger Katalase sie enthalten. — Bemerken möchte ich noch, daß diese Notizen über die Färbung der Extrakte vor der Untersuchung ihres Katalasengehaltes gemacht wurden.

Eine andere Beobachtung, die ein eingehenderes Studium verdiente, ist die, daß das Gewicht der Räupchen je nach den Belichtungsbedingungen variiert. Für gewöhnlich wurden zur Herstellung eines „Normal"-Extraktes eine bestimmte Anzahl Räupchen abgezählt und mit der gleichen Zahl Kubikzentimeter Chloroformwasser verrieben. Im Laufe der Versuche fiel es nun aber auf, daß diese Räupchen zuweilen deutlich verschiedene Größe, insbesondere Dicke hatten, und die Gewichtsbestimmung zeigte, daß auch ihr Gewicht verschieden war. So wogen je 20 Räupchen, welche zur Herstellung der Extrakte von Versuch 36 benutzt wurden:

Hell:	50 mg;	ein	Räupchen	= 2.5 mg
Dunkel:	35 „	„	„	= 1.8 „
Gelb:	32 „	„	„	= 1.6 „
Violett:	30 „	„	„	= 1.5 „

Die Unterschiede sind also sehr beträchtlich. In einem andern, hier nicht mitgeteilten Versuch, bei dem die „Hell"-

Räupchen nur ca. 2 Tage belichtet worden waren, war der Unterschied zwar kleiner, jedoch gleichsinnig:

Hell: 20 Räupchen wogen 40 mg
Dunkel: 20 „ „ 38 „

In einem dritten Falle dagegen, in welchem die Räupchen ebenfalls nur 2 Tage belichtet gewesen waren, war der Unterschied wieder sehr deutlich (siehe Versuch 28, Tabelle 23).

Hell: 20 Räupchen wogen 50 mg
Dunkel: 20 „ „ 40 „
usw.

Die Unterschiede zwischen „Hell"- und „Dunkel"-Räupchen haben also immer den gleichen Sinn: die Räupchen nehmen deutlich bei Belichtung an Gewicht zu. Es erinnert dies sehr interessante Verhalten an die Versuche von M. von Linden[1]) über die Gewichtszunahme von Schmetterlingspuppen in kohlensäurereicher Atmosphäre. — Ein Zusammenhang zwischen der Gewichtsvermehrung und der Änderung des Katalasengehaltes läßt sich auf Grund der obigen Versuche mit farbigem Licht nicht feststellen.

§ 24. Zusammenfassung. Die wichtigsten Resultate und Folgerungen der in Abschnitt C mitgeteilten Versuche sind folgende:

1. Gleich den Fermentlösungen und Reaktionsgemischen erleiden auch die lebenden Räupchen von Porthesia chrysorrhoea bei Belichtung einen beträchtlichen Verlust an Katalase. Dies wurde durch Untersuchung von „Normal"-Extrakten von Räupchen, die im Dunkeln, und solchen, die im natürlichen Licht gehalten wurden, festgestellt. Dieser Unterschied ist auch bei Berücksichtigung der Temperatur sowie bei Benutzung des Materials aus einem Neste stets vorhanden.

2. Im Dunkeln findet sowohl bei einer Temperatur von 8 bis 10°, als auch von 15 bis 19° anfänglich eine Vermehrung der Katalase statt, welche aber bei längerer Versuchsdauer regelmäßig in eine Abnahme der Katalase übergeht. Dieser An- und Abstieg findet viel schneller bei der genannten höheren als bei der tieferen Temperatur statt. Die anfängliche Ver-

[1]) M. von Linden: Siehe die zusammenfassenden Autorreferate im Zool. Zentralblatt.

mehrung ist jedenfalls auf eine Steigerung der physiologischen Funktionen infolge der im Vergleich zur Überwinterungstemperatur der Nester (nicht über 6°) in beiden Fällen höheren Versuchstemperatur zurückzuführen.

3. Der Einfluß der Wellenlänge des Lichts auf den Katalasengehalt lebender Räupchen ist ein ziemlich verwickelter.

Während der ersten ca. 3 Versuchstage nimmt der Katalasengehalt in folgender Reihenfolge ab: Gelb > Dunkel > Violett > Hell. Es zeigt sich insofern ein wichtiger Unterschied im Vergleich zu dem entsprechenden Verhalten von Fermentextrakten und Reaktionsgemischen, als im gelben Lichte der größte Katalasengehalt gefunden wurde. Der Grund hierfür liegt darin, daß zunächst die anfängliche Steigerung des Katalasengehaltes, wie sie im Dunkeln bereits festgestellt wurde, auch im gelben Lichte, aber hier in einem noch größeren Umfang stattfindet. Sodann wird auch die Konservierung der Katalase resp. vielleicht die physiologische, der Lichtzerstörung entgegenwirkende Neubildung der Katalase durch die gelben Strahlen begünstigt. Im Gegensatz hierzu läßt sich im violetten Lichte keine anfängliche Vermehrung beobachten; der Gehalt nimmt mit der Belichtung stetig ab. Es scheint also die physiologische Bildung der Katalase ein Prozeß zu sein, welcher im Vergleich zur Dunkelreaktion durch gelbe Strahlen begünstigt, durch violette dagegen gehemmt wird, in ähnlicher Weise, wie dies von Trautz und Thomas für gewöhnliche chemische Reaktionen gefunden worden ist. — Eine vorübergehende Vermehrung der Katalase auch im gemischten, aber schwachen diffusen Licht, welche voraussichtlich auf die Wirkung der im gemischten Licht vorhandenen gelben Strahlen zurückzuführen ist, wurde einmal beobachtet.

Bei längerer Versuchsdauer (über 3 Tage) sterben die Räupchen bei gleichen Temperatur- usw. Bedingungen in folgender Reihenfolge: Gelb, Violett, Dunkel, Hell. Es zeigt sich also, daß die normale positiv phototrope Reaktion der Räupchen in der Tat eine lebenserhaltende ist, ein Umstand, der für die physiologische Theorie des Phototropismus von Wichtigkeit ist. Beim Vergleich der Sterblichkeit mit dem Katalasengehalt von zwar noch lebenden, aber kurz vor dem Absterben befindlichen Räupchen ergibt sich, mit Ausnahme zunächst von „Violett“

daß die Räupchen mit dem höchsten Katalasengehalt am ehesten sterben, der Katalasengehalt nimmt in diesen Versuchsstadien ab in der Reihenfolge: Gelb > Dunkel > Hell; die gleiche Reihe zeigt die Sterblichkeit. Im violetten Licht nimmt der Katalasengehalt während der letzten Lebenszeit der Räupchen außerordentlich stark ab und sinkt unter sämtliche anderen Werte. Trotzdem sterben die Räupchen nicht am spätesten, sondern nach den im gelben Licht gehaltenen. Der Grund hierfür liegt, wie des näheren auseinandergesetzt wird, mit großer Wahrscheinlichkeit darin, daß ebenso, wie zu intensive Beleuchtung eine Umkehrung der positiven phototropen Reaktion vieler Tiere in eine negative Reaktion veranlaßt, auch eine übermäßige Zerstörung der Katalase schädlich wirkt. Diese übermäßige Zerstörung der Katalase im violetten Lichte wird darauf zurückgeführt, daß das violette Licht, wie schon aus dem Fehlen der sonst allgemein gefundenen anfänglichen Steigerung des Katalasengehaltes hervorgeht, jede Neubildung oder Regeneration der zerstörten Katalase hindert.

4. Weiterhin wurde eine Variation der Färbung der Extrakte, die aus unter verschiedenen Belichtungsbedingungen gehaltenen Räupchen hergestellt wurden, beobachtet. Die Extrakte aus „Dunkel"-Raupen waren weniger gelblich als die der „Hell"-Raupen gefärbt. Ein Vergleich zwischen dem Einfluß der Wellenlänge des Lichts auf den Katalasengehalt und die Färbung der Extrakte ergab, daß die Extrakte um so gelblicher sind, je weniger Katalase sie enthalten.

Endlich wurde gefunden, daß die Räupchen im Hellen im Vergleich zu den „Dunkel"-Räupchen regelmäßig an Gewicht zunehmen. Ein Zusammenhang zwischen dieser Gewichtsveränderung und dem Katalasengehalt ließ sich nicht feststellen; die Gewichte der Räupchen nahmen in einem Versuch über den Einfluß farbigen Lichts ab in der Reihenfolge: Hell > Dunkel > Gelb > Violett, der Katalasengehalt in der Reihe: Dunkel > Hell > Violett > Gelb.

III. Über die Lichtempfindlichkeit tierischer Peroxydasen.

§ 25. Wie schon oben erwähnt, liefern die Methoden, mittels derer man einen peroxydasehaltigen Extrakt auf seinen

Peroxydasengehalt untersuchen kann, zurzeit keine quantitativen Resultate. Auch der nächstliegende Versuch, durch colorimetrische Bestimmung eine annähernd quantitative Schätzung der Tiefe der Färbung und damit, unter Voraussetzung der Proportionalität zwischen Peroxydasengehalt und Farbtiefe, des Peroxydasengehalts auszuführen, scheitert daran, daß die Reaktionsgemische beträchtlich in ihrem Farbton variieren, und zwar von gelblichgrün bis blauviolett. Diese Unterschiede machen sich sogar bei ein und derselben Lösung bemerkbar, insofern, als eine blaue Lösung beim Verdünnen oft grünlich wird. Auf diese und weitere Schwierigkeiten ist schon in meiner zitierten Arbeit über die Oxydasen der Geschlechtszellen hingewiesen worden. Ich möchte es indessen keineswegs für ausgeschlossen halten, daß die Ausarbeitung einer quantitativen colorimetrischen Methode gelingt, falls man einen eindeutigeren und empfindlicheren Indikator findet. Allerdings ist dabei nicht zu vergessen, daß vielleicht im Sinne von Bach und Chodat zweierlei Stoffe, ein echtes, sauerstoffübertragendes Ferment und ein organisches Peroxyd in den zu untersuchenden Lösungen vorhanden sind und daß man sich bei der Wahl eines Indikators eventuell entscheiden muß, welchen von den genannten Stoffen man mit ihm untersuchen will. Zur Ausarbeitung einer eindeutigen Methode ist eine große Anzahl von Voruntersuchungen, welche zunächst mit Sicherheit die Existenz der beiden genannten Stoffe, sodann aber auch die sicherlich sehr engen und wichtigen Beziehungen zwischen denselben feststellen müssen, notwendig. Ich habe mir daher mit der bekanntesten Nachweismethode für derartige Stoffe der Guajacharzoxydation genügen lassen müssen, halte aber selbst eine Nachprüfung der im folgenden geschilderten Resultate an der Hand einer besseren Methode äußerst wünschenswert. Einen Vorteil hat die Guajacprobe insofern, als sowohl typische Peroxyde allein (z. B. Benzoylsuperoxyd), aber auch tierische Extrakte ohne H_2O_2, als auch tierische Extrakte, welche ohne H_2O_2 keine Reaktion geben, nach Bach und Chodat also nur echte Fermente enthalten, eine Blaufärbung erzeugen. Die Guajacprobe würde also sowohl das Vorhandensein von Peroxydasen als auch von Peroxyden anzeigen. Diese Reaktionen verlaufen verschieden schnell und deutlich; regelmäßig scheint einstweilen nur die Tatsache zu

sein, daß sie sämtlich mit H_2O_2 schnellere und stärkere Färbungen ergeben.

Die nähere Versuchstechnik, welche ich bei den Guajacproben anwendete, habe ich in meiner zitierten Arbeit ausführlich beschrieben. Bemerken möchte ich nur, daß auch hier mit Guajacharzsuspensionen, d. h. in möglichst rein wässerigem Medium gearbeitet wurde. Die Vorteile dieser Methode habe ich auch früher auseinandergesetzt. Die alkoholische Guajaclösung wurde meist wöchentlich frisch hergestellt, in dicht mit Stanniol umwickelten, verkorkten und möglichst ins Dunkle und Kühle gestellten Flaschen aufbewahrt. Das Harz wurde von einem sehr großen Stücke losgeschlagen; Stücke mit Flächen, welche der Luft und dem Licht ausgesetzt waren, wurden nicht verwendet. Wie die gute Filtrierbarkeit auch konzentrierter Lösungen zeigte, war das Harz ziemlich rein. Diese Vorsichtsmaßregeln waren insbesondere angesichts der Resultate der zitierten Abhandlung von P. Waentig notwendig.

Schließlich möchte ich noch kurz auf die äußere Form, in der die Resultate dieser Versuche wiedergegeben sind, sowie auch auf die Fehler eingehen, welche bei der hier geübten subjektiven Methode möglich sind. Die Resultate der im folgenden beschriebenen Versuche sind im allgemeinen in der Form ausgedrückt, daß beim Vorhandensein des gleichen Farbtones, aber bei verschiedener Intensität ein entsprechendes Ungleichheitszeichen gemacht ist, also z. B. $H > D$. Sind die Unterschiede der Intensität sehr erhebliche, so ist das Ungleichheitszeichen unterstrichen z. B. $H \geq D$; sind sie sehr schwach, so steht $H \gtrsim D$. Treten aber außerdem noch wesentliche Verschiedenheiten im Ton der Färbung ein, so ist hierüber im Text das Nähere gesagt worden. — Was die subjektiven Fehler in der Beurteilung besonders der Farbintensität der Lösungen anbetrifft, so möchte ich gleich hervorheben, daß die in Betracht kommenden Unterschiede im allgemeinen so grobe sind, daß ein Irrtum ausgeschlossen erscheint. Indessen habe ich oft, wenn sich die Gelegenheit ergab, und regelmäßig in zweifelhaften Fällen, d. h. bei kleinen Unterschieden, andere vollständig objektive Personen bei zugedeckten oder unverständlichen usw. Etiketten die Lösungen

in bezug auf Farbintensität und Farbton rangieren lassen. In seltenen Fällen ergab sich dabei eine Differenz mit meinen Beobachtungen. War eine solche aber vorhanden, so ist sie mit angeführt worden. Die Versuche, in welchen nur ich die Reihenfolge der Lösungen entschied, Versuche, die durchweg aber zweifelsfreie und eindeutige Resultate ergaben, habe ich mit einem Sternchen in Klammern versehen. Bei Prüfung durch mehrere Personen habe ich so viel Sternchen hingeschrieben, als Prüfende vorhanden waren. Ich habe zuweilen denselben Versuch von 5 bis 6 Personen nachprüfen lassen.

§ 26. Die zur Untersuchung gelangenden Lösungen waren Chloroformwasserextrakte von verschiedenen tierischen Körpersäften und Organen. Ausführlicher untersucht habe ich den Chloroformwasserextrakt des Darminhaltes hungernder Mehlwürmer, in welchen bekanntlich bereits Biedermann die Guajacperoxydase fand, ferner die Hämolymphe von Hydrophilus, Dytiscus, welche im vorigen Teil auch auf ihre Katalase untersucht wurde, ferner die Hämolymphe erwachsener Raupen von Cossus ligniperda sowie die im vorigen Teil vielfach benutzten Extrakte von jungen Porthesia-Räupchen. Was den Gehalt dieser Extrakte an Guajacperoxydase anbetrifft, so sind die Mehlwurm-, Hydrophilus- und Dytiscus-Auszüge außerordentlich reich; die Cossus-Extrakte geben für gewöhnlich nur schwache Reaktionen und die Porthesia-Auszüge in sehr interessanter Weise unter normalen Umständen auch nach längerem Stehen gar keine Reaktion. Ein Punkt von besonderer Wichtigkeit ist der, daß die drei erstgenannten Extrakte bei genügender Konzentration mit kaum einer Ausnahme sofort nach der Herstellung des Extraktes die Guajacreaktion geben. Bereitet man ca. 5 ccm einer wässerigen oder mit wenig H_2O_2 versetzten Guajacsuspension vor, sticht den Hinterleib eines mit Chloroform betäubten Dytiscus oder Hydrophilus an und läßt bei vorsichtigem Drücken einen Tropfen Hämolymphe in das Reagensrohr fallen, so findet häufig schon in der ersten halben Minute. regelmäßig aber innerhalb der ersten 5 Minuten eine deutliche Grün- bis Blaufärbung statt. Dieser Versuch ist wichtig, weil er zeigt, daß die Guajacperoxydase entweder im lebenden Tiere schon vorhanden ist, oder aber, falls man auf Grund der Pfefferschen Versuche dieser Annahme kritisch

gegenübersteht, sich mit ungeheurer Geschwindigkeit bildet. Jedenfalls wäre eine derartige Bildungsgeschwindigkeit von ganz anderer Größenordnung als die Verstärkung der Guajacreaktion, welche man, wie schon oft beobachtet wurde, dann erhält, wenn man tierische und pflanzliche Extrakte längere Zeit unter Luftzutritt stehen läßt. Daß eine derartige, allerdings nicht unbegrenzt fortschreitende Vermehrung des Peroxydasengehalts auch bei den hier verwendeten Extrakten stattfindet, zeigen z. B. die folgenden Versuche.

Versuch 36 (P. III. 11). Der ausgequetschte, bräunlich gefärbte Darminhalt hungernder Mehlwürmer (ca. 1 Darminhalt auf 1 ccm Wasser) wurde mit Chloroformwasser verrieben, das Gemisch filtriert. Gleich nach der Herstellung wurde folgendes Gemisch untersucht:

1. 2 ccm E (Extrakt) + 2 ccm W (Wasser) + 2 Tr (Tropfen) Gu (Guajaclösung).

Sofort ergab sich eine schwach grünlich blaue Färbung, die nach 10 Minuten schwach, aber deutlich blau war. (*) Die Färbung nahm nur wenig in den nächsten Stunden bei Aufbewahrung im diffusen schwachen Lichte zu.

2. Nachdem der E 12 Stunden lang in einem fest zugekorkten Reagensrohr, dabei ca. 4 Stunden in diffusen Tageslicht und bei Zimmertemperatur gestanden hatte, wurde ebenfalls gemischt

2 ccm E + 2 ccm W + 2 Tr Gu.

Die Mischung wurde sofort beim Zusatz des Gu bläulich und war nach etwa 6 Stunden. (in schwachem diffusen Licht) deutlich blauer als das Reaktionsgemisch 1 (*).

Versuch 37 (P. V. 99). Es wurde ein frischer Extrakt dadurch hergestellt, daß einige Tropfen Hämolymphe einer chloroformierten Cossus-Raupe mit Chloroformwasser verdünnt wurden. Das Kölbchen mit dem Extrakt wurde verschlossen im Halbdunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

1. Unmittelbar nach der Herstellung des Extraktes wurden gemischt

2 ccm E + 2 Tr Gu,

Sofort ergab sich eine schwach grünliche Färbung, die nach 24 stündigem Stehen im Dunkeln tiefgrün wurde (*).

2. Nach 24 stündigem Stehen wurden gleichfalls 2 ccm E + 2 Tr Gu gemischt. Diese zweite Probe, welche ebenfalls sofort nach der Mischung schwach grünlich aussah, und ebenfalls im Dunkeln aufbewahrt wurde, war nach 24 weiteren Stunden noch nicht ganz so grün, nach weiteren 24 Stunden (insgesamt 48 stündigem Stehen) aber deutlich grüner als 1. (*)

3. Nachdem der Extrakt weitere 24 Stunden, im ganzen also 48 Stunden alt geworden war, wurde dieselbe Probe vorgenommen. Nach 16stündigem

Verweilen im Dunkeln war die Probe 3 fast gleich Probe 2, deutlich grüner aber als Probe 1. Nach insgesamt 72stündigem Stehen ergab sich die Reihenfolge c > b > a. Hierbei war c am blaugrünsten, während a bräunlichgrün aussah (*).

4. Nachdem der Extrakt 72 Stunden alt geworden war, wurde eine weitere Probe angestellt. Nach insgesamt 96stündigem Verweilen der Proben im Dunkeln ergab sich: d > c ≳ b > a (**).

Man könnte gegen diesen Versuch als Beweis für das Zunehmen der Peroxydase beim Stehen an der Luft folgendes einwenden. Es ist vielleicht jedem Forscher, der mit Guajacproben arbeitet, bekannt, daß das blaue Oxydationsprodukt der Guajaconsäure sich bei längerem Stehen namentlich im Licht weiter zu einem farblosen resp. schmutzig graubraun gefärbten Produkt umwandelt. Ob dies Produkt das Resultat einer weiteren Oxydation ist, ist nicht bekannt, wohl aber aus verschiedenen Gründen wahrscheinlich. Nun könnte man denken, daß die späteren Proben darum beim Vergleich eine stärkere Färbung zeigten, weil die ersten Proben sich bereits weiter zersetzt hatten. Indessen haben mir speziell auf diesen Punkt gerichtete Versuche, in denen eine Guajacprobe mit einem speziell hergestellten wässrigen Gemisch von Aquarellfarben verglichen wurde, gezeigt, daß diese sekundäre Zersetzung viel zu langsam vor sich geht, als daß sie bei dem betr. Versuch wenigstens innerhalb der ersten drei Tage in Frage käme, und daß namentlich im Dunkeln aufbewahrte und ohne H_2O_2 hergestellte Proben 3—4 Tage fast unverändert blieben. Außerdem spricht gegen den maßgebenden Einfluß dieses Faktors der Umstand, daß bei Probe 3 zum ersten Male eine deutlich blaugrüne Färbung auftrat, welche interessanterweise bei Probe 4 nicht in derselben Stärke zum Vorschein kam. Dieser letztere Punkt stimmt überein mit der Erfahrung, daß alle Extrakte unter beliebigen Bedingungen mit der Zeit eine Schwächung ihres Peroxydasengehaltes erleiden.

Einige weitere Versuche über den Einfluß des Alters sind folgende.

Versuch 38 (P. IV. 67). Ein frischer Extrakt aus Dytiscus-Hämolymphe wurde sofort nach der Herstellung in folgender Weise untersucht:

1. 2 ccm E + 2 Tr Gu.

Die Mischung ergab nach ca. $1^1/_2$ Stunden eine deutliche Bläuung,

welche während der nächsten Stunden sich noch deutlich vertiefte (*). Der in einem verkorkten Kölbchen aufbewahrte Extrakt sowie die erste Probe wurden im Dunkeln aufbewahrt.

2. 6 Stunden nach Entnahme der ersten Probe wurde eine zweite in gleichen Verhältnissen gemischt. Dieselbe war bereits nach einer halben Stunden viel blauer als Probe 1 (**).

3. Nachdem der Extrakt 30 Stunden alt geworden war, wurde eine dritte Probe in gleicher Weise angestellt. Das Gemisch bläute sich viel langsamer als Probe 1 und 2 und war nach 24stündigem Stehen noch nicht so blau wie 1 geworden. Wohl aber hatte das Gemisch eine intensiv grüne Färbung angenommen. (**).

Versuch 39 (P. N. 50). Ein frischer Extrakt wurde aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer hergestellt und sofort nach der Herstellung eine Probe in folgender Mischung hergestellt:

1. 1 ccm E + 3 ccm W + 2 Tr Gu.

Extrakt wie erste Probe wurden sorgfältig im Dunkeln bei einer Temperatur von ca. 15.5 bis 17.0° aufbewahrt. Nach 20 Stunden hatte Probe 1 eine milchig grünlichblaue Farbe angenommen.

2. 20 Stunden nach der ersten Probe wurde eine zweite in gleicher Mischung hergestellt. Dieselbe gab nach 8stündigem Stehen (im Dunkeln) eine bedeutend tiefere blaugrüne Färbung als 1 (**).

3. Nachdem der Extrakt insgesamt 28 Stunden alt geworden war, wurde eine weitere Probe vorgenommen. Nachdem dieselbe 15 Stunden im Dunkeln gestanden, ergab sich in bezug auf die Tiefe der Färbung die Reihenfolge $3 > 2 \geq 1$ (**).

4. Als der Extrakt 43 Stunden alt geworden war, wurde wiederum eine Probe vorgenommen. Nachdem diese aber 4 Stunden im Dunkeln gewesen war, hatte sie nur eine schwach grünliche Färbung angenommen, welche bedeutend schwächer als die von 3 und 2, etwas stärker als die von 1 war. Diese Reihenfolge $3 > 2 > 4 > 1$ (**) war auch nach 25stündigem Stehen der Probe dieselbe geblieben.

Aus den Versuchen 38 und 39 geht hervor, daß eine Vermehrung des Peroxydasengehaltes auch im Dunkeln vor sich geht. Allerdings aber tritt gleichzeitig ein bemerkenswerter Unterschied hervor, insofern als die Steigerung des Peroxydasengehaltes in diffusem Licht noch nach 72 Stunden nicht beendet ist, während im Dunkeln bereits nach 30 resp. 43 Stunden eine deutliche Abnahme stattfindet. Dieser Unterschied ist interessant im Zusammenhang mit den weiter unten zu besprechenden direkten Versuchen über den Einfluß der Belichtung auf den Peroxydasengehalt von Extrakten und wird in diesem Sinne später noch herangezogen werden.

Auch bei diesen Versuchen habe ich es vorgezogen, die

natürlichen Extrakte und nicht durch Alkoholfällung usw. gereinigte Fermentlösungen zu untersuchen.

Dies geschah wiederum in der Absicht, Substanzen zu verwenden, welche sich so wenig als möglich von den im lebenden Organismus vorkommenden unterschieden resp. so wenig als möglich durch sekundäre chemische und phsyikalische Einflüsse verändert waren, dann aber auch in der Hoffnung, durch Untersuchung gleich einer größeren Zahl von Variablen eher Beziehungen und Parallelen zu den biologischen Verhältnissen zu finden, als es bei der Verwendung isolierter und dabei sicherlich weitergehend veränderter Stoffe zu erwarten war. Für eine speziell chemische, reaktionskinetische Untersuchung sind natürlich möglichst gereinigte und isolierte Fermentlösungen unbedingt vorzuziehen. Von der Katalase läßt sich die Peroxydase vielleicht am besten mit 50%igem Alkohol trennen. Der meist nur langsam ausfallende zentrifugierte Niederschlag enthält den größeren Teil der Katalase, während die darüberstehende alkoholische Lösung meist recht kräftige Guajacreaktionen gibt. Über die Grundlagen einer anderen Fermentmethode dieser beiden Fermente unter Zerstörung der Katalase wird weiter unten berichtet werden. Im allgemeinen ist es leichter, eine katalasenreiche und peroxydasenarme Lösung herzustellen als umgekehrt, insofern als z. B. der unveränderte Porthesia-Extrakt fast nur Katalase enthält, auf der andern Seite dagegen alle peroxydasenreichen Extrakte, die von mir untersucht wurden, meist sogar recht kräftig H_2O_2 zersetzten. In der Tat scheint die Verbreitung der Katalase allgemeiner als die der Peroxydase zu sein, wenn schon nicht zu vergessen ist, daß die Guajacreaktion im Vergleich zur H_2O_2-Zersetzung wahrscheinlich viel weniger empfindlich ist.

§ 27. Was die Einteilung der Versuche über die Lichtempfindlichkeit der Guajacperoxydase anbetrifft, so ist eine Anordnung, die den im I. Teil beschriebenen Katalaseversuchen entspricht, am nächstliegendsten. Wir hätten also wieder A den Einfluß der Belichtung auf die Fermentlösung selbst, B den Einfluß der Belichtung auf die Reaktionsgemische und die Reaktion und C den Einfluß der Belichtung auf den Peroxydasengehalt lebender Tiere zu untersuchen. Indessen ist schon in der Einleitung erwähnt worden, daß das Guajacharz

selbst namentlich in fein verteiltem Zustande und in Gegenwart von Wasser lichtempfindlich ist und sich allmählich zu dem bekannten blauen Produkt oxydiert. Es ist auch betont worden, daß diese Oxydation durch violettes Licht begünstigt wird, während gelbe oder rote Strahlen nicht nur hemmend wirken, sondern sogar nach vielleicht nicht ganz einwandfreien Versuchen eine Reduktion hervorrufen sollen. Würden wir also Reaktionsgemische verschiedenen Belichtungsbedingungen aussetzen, so würden sich die photochemischen Veränderungen des suspendierten Guajacharzes über etwaige photochemische Beeinflussungen der Peroxydase lagern und das Resultat verwickelt resp. mehrdeutig machen. Man könnte derartige Versuche ausführen, indem man stets eine entsprechende Reihe von Versuchsgläsern mit Reaktionsgemischen ohne Ferment belichtet und die bei diesen Versuchen erzielten Färbungen auf irgend eine Weise von den Färbungen der Ferment-Reaktionsgemische abzieht. Indessen ist dies Verfahren bei einer nur qualitativen Gehaltsbestimmung schwierig ausführbar, und obgleich ich eine große Anzahl derartiger Versuche angestellt habe, möchte ich doch der Kürze halber von ihrer Schilderung hier absehen, namentlich da sie im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen nichts Neues ergaben resp. analoge Beobachtungen in ein klareres Licht setzten.[1]) Demzufolge werde ich nur zwei Gruppen von Versuchen über die Lichtempfindlichkeit peroxydasehaltiger Extrakte, nämlich die unter A und C genannten beschreiben.

A. Über die Lichtempfindlichkeit tierischer peroxydasehaltiger Extrakte.

§ 28. Die Versuche über den Einfluß der Belichtung auf die Guajacreaktion peroxydasehaltiger Extrakte ergaben zunächst un-

[1]) Ich nehme hieraus die Schilderung einiger Versuche mit anfänglichem Guajakzusatz (aber ohne H_2O_2), welche über den Einfluß schwacher Belichtung auf alte Extrakte angestellt wurden. Wie aus § 29 hervorgehen wird, ist die Lichtwirkung bei diesen Bedingungen auf den Peroxydasengehalt gerade entgegengesetzt der Wirkung der Belichtung auf Guajacsuspension allein. Eine intensivere Färbung des Guajacs im Dunkeln könnte dann nur auf eine ganz besonders ausgesprochene Lichtwirkung auf die Peroxydase selbst zurückgeführt werden.

gemein komplizierte Erscheinungen, insofern als bei verschiedenen Lösungen und Versuchsbedingungen ganz entgegengesetzte Resultate zum Vorschein kamen. Ich habe eine recht beträchtliche Anzahl von Versuchen anstellen müssen, um das Gesetz oder die Ursachen dieser zunächst scheinbar ganz unregelmäßigen Beeinflussung durch das Licht aufzufinden, und obgleich die allgemeinen Resultate dieser Fermente mir jetzt gestatten, falls Alter und Belichtungsbedingungen bekannt sind, den Sinn der Lichtwirkung vorauszusagen, so bleibt doch noch eine ganze Anzahl von Einzelproblemen recht verwickelter Natur zu untersuchen. Ich möchte nun hier nicht im einzelnen auf all die Versuche in der Reihenfolge eingehen, in der ich sie anstellte. Vielmehr werde ich zunächst einige allgemeinere Resultate vorwegnehmen und diese nachher durch Schilderung der betreffenden Versuche erhärten.

Das allgemeinste Resultat dieser Versuche ist vielleicht folgendes: Das Licht übt je nach seiner Intensität oder seiner Einwirkungsdauer einen sehr verschiedenen, ja sogar einen entgegengesetzten Einfluß auf peroxydasehaltige Extrakte aus, insofern als bei schwacher oder kurzer Belichtung eine deutliche Hinderung in der natürlichen Peroxydasevermehrung frischer Extrakte, bei stärkerer oder längerer Belichtung dagegen eine ebenfalls ausgesprochene Vermehrung des Peroxydasengehaltes stattfindet. Ein Altern des Extraktes wirkt begünstigend auf die erste Lichtwirkung, welche in einer Verminderung der Peroxydase besteht; es dauert mit andern Worten bei alten Extrakten länger, resp. bedarf stärkerer Lichtintensitäten, bis eine Vermehrung der Peroxydase durch Belichtung stattfindet. Im gleichen Sinne wirkt die Konzentration des Extraktes, insofern als in verdünnteren Extrakten bei schwächerer Belichtung oder nach kürzerer Zeit die Lichtwirkungen zweiter Art (welche eine Vermehrung des Peroxydasengehaltes der belichteten Extrakte bewirken) die hindernden Lichteinflüsse erster Art überdecken. — Zur Abkürzung wollen wir im folgenden die Lichtwirkungen, welche eine Peroxydasenentwicklung hindern, als „negative", die Lichtwirkungen, welche im Gegensatz hierzu eine Vermehrung des Peroxydasengehalts hervorrufen, als „positive" Lichteffekte bezeichnen.

Diese Sätze werden nun durch folgende Versuche bewiesen.

§ 29. Zunächst seien einige Beispiele für die „negative" Wirkung von kurzer oder schwacher Belichtung auf frische und alte, konzentriertere und verdünntere Extrakte angeführt.

Versuch 40 (P. IV. 49). Der Darminhalt eines überwinternden Dytiscus, welcher wenigstens zwei Monate gehungert hatte, wurde mit Chloroformwasser verrieben und filtriert. Ein Teil des Extraktes wurde sofort nach der Herstellung in ein helles, ein anderer in ein verdunkeltes Röhrchen gegeben und beide Röhrchen im Wasserbad dem diffusen Tageslicht (Februar) ausgesetzt.

1. Nach $^1/_2$stündiger Belichtung wurden gemischt
H. 1 ccm E + 2 ccm W + 2 Tr Gu.
D. dasselbe.

Bereits nach 5 Minuten erscheint D grünlich blauer als H (*).

2. Nach 6stündiger Belichtung wurde eine gleiche Probe entnommen und mit Wasser und Guajac versetzt. Nach $^1/_2$ Stunde ist kaum ein Unterschied vorhanden. Nach ca. 1 Stunde ist D > H (*).

3. Nachdem die Extrakte im ganzen ca. 3 Tage dem natürlichen diffusen Lichte ausgesetzt gewesen waren, wurde eine dritte Probe angestellt. Dieselbe ergab nach ca. 1 Stunde H sehr wenig blauer als D (*).

Versuch 41 (P. IV. 66). Es wurde ein sehr konzentrierter Extrakt aus der Hämolymphe eines Hydrophilus verwendet. Das verdunkelte und das erhellte Röhrchen standen ca. 6 Stunden im diffusen Tageslicht (Februar). Es wurden gemischt

H. 2 ccm E + 2 ccm W + 2 Tr Gu;
D. dasselbe.

Zunächst kein Unterschied, beide Gemische außerordentlich stark blau gefärbt, so daß beide aufs Dreifache verdünnt wurden. Nach ca. 10 Minuten erscheint D blauer als H, welch letzteres mehr grünlich ist. Nach ca. 30 Minuten D fraglos blauer und dunkler als H. Unterschied wird immer stärker (*).

Versuch 42 (P. N. 55). Ein ca. 4 Tage alter, im Halbdunkeln aufbewahrter Extrakt aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer wurde in ein verdunkeltes und in ein helles Reagensrohr gegeben und im diffusen Tageslicht (Dezember) stehengelassen. Nach einstündiger Belichtung wurde gemischt

1. H. 1 ccm E + 2 ccm W + 1 Tr Gu + 1 ccm H_2O_2;
D. dasselbe.

Nach 5 Minuten war kaum ein Unterschied erkennbar, nach 10 Minuten ist D $\gtrsim$ H, nach 20 Minuten D > H, nach 2 Stunden ebenfalls D $\geq$ H (**).

2. Nach insgesamt 4stündiger Belichtung (die letzte Stunde sehr schwaches Dämmerungslicht) wurde eine gleiche Probe gemischt. Nach 10 Minuten sehr deutlich $D \geq H$, ebenfalls nach 2 Stunden (**).

3. Nach zwei weiteren Stunden Belichtung durch einen Auerbrenner (insgesamt 6 Stunden schwache diffuse Belichtung) ergab eine weitere Probe ebenfalls nach 10 Minuten Stehen $D > H$ (**).

4. Nach insgesamt 32 Stunden Auerbelichtung ergab sich bereits nach 5 Minuten $D > H$ (*), nach 10 Minuten sehr deutlich $D \geq H$ (**).

5. Nach 56 Stunden ununterbrochener Auerbelichtung dagegen ergab sich $H > D$ (**). (Siehe hierüber § 34.)

Ich möchte bei diesem Versuch bemerken, daß **gleichzeitig** und unter vollständig gleichen Bedingungen auch Versuche mit **frischen** Extrakten angestellt wurden, welche sämtlich den Unterschied $H > D$ ergaben (siehe später Versuch 62 und 63).

Versuch 43 (P. IV. 73). Ein peroxydasenhaltiger Extrakt wurde dadurch hergestellt, daß ein Dytiscus, dessen Körperhöhle geöffnet und dessen Hämolymphe soweit als möglich ausgespült und zu einem andern Extrakt verwendet worden war, in Chloroformwasser mehrere Tage liegen gelassen wurde. Es ergab sich ein recht peroxydasenreicher Extrakt. (NB. Es zeigten auch noch zweite und dritte „Aufgüsse" deutliche Peroxydasenreaktionen.) Von diesem Extrakt wurde in ein verdunkeltes und in ein helles Röhrchen gegeben und mit Auerlicht belichtet:

H. 5 ccm W + 2 Tr E + 2 Tr Gu;
D. dasselbe.

Es wurde also die Guajactinktur **zu Beginn** des Versuchs den Extrakten zugefügt, und auf Grund der Versuche über die Bläuung des Guajacs in **rein** alkoholischer Lösung oder rein wässeriger Suspension sollte man erwarten, daß das belichtete Gemisch sich eher oder stärker blau färbte als das verdunkelte. Statt dessen wurde gerade das entgegengesetzte Resultat erhalten: bereits nach 10 Minuten war D **deutlich blauer als** H, welch letzteres eine mehr gelbgrünliche Farbe zeigte. Der Unterschied blieb derselbe während zirka der nächsten 3 Stunden (**); nach 15 Stunden Belichtung war dagegen kaum noch ein Unterschied zwischen beiden Lösungen festzustellen (**).

Versuch 44 und 45 (P. IV. 71 und 72). Ein ca. 40 Stunden alter, sehr konzentrierter Hämolymphe-Extrakt von Dytiscus wurde in folgender Weise mit Wasser und Guajac gemischt und sodann mit Auerlicht belichtet:

I. H. 5 ccm W + 1 Tr E + 2 Tr Gu;
D. dasselbe.
II. H. 5 ccm W + 2 Tr E + 2 Tr Gu;
D. dasselbe

Alle vier Versuchsgläser wurden unter ganz gleichen Bedingungen belichtet.

I. Nach 10 Minuten kaum ein Unterschied, nach 15 Minuten jedoch D deutlich blauer als H, welch letzteres einen mehr gelblichgrünen

Ton hat. Der Unterschied bleibt während einer Stunde Belichtung deutlich derselbe, wird ev. noch stärker (**).

II. Bereits nach 5 Minuten erscheint D ein wenig dunkler als H. Nach 15 Minuten D ganz ausgesprochen dunkler und blauer als H. Unterschied bleibt während einer Stunde Belichtung (**).

Nach 15 Stunden Belichtung waren in allen vier Gefäßen die Unterschiede verwischt.

Ich habe diese letzten drei Versuche, in welchen schon zu Beginn der Belichtung Guajac zugesetzt worden war, darum hier an Stelle weiterer Versuche mit nachträglicher Guajacprobe angeführt, weil sie mir besonders drastisch das Verhalten alter Extrakte bei schwacher Belichtung zu illustrieren scheinen. Daß einerseits reine Guajaclösung oder Suspension sich stets bei Belichtung stärker bläut als im Dunkeln sowie daß andrerseits zu Beginn der Belichtung mit Guajac versetzte frische und stark belichtete Extrakte ebenfalls im Licht viel schneller sich färben, davon habe ich mich durch sehr zahlreiche Versuche, deren Beschreibung hier zu weit führen würde, überzeugt. — Des weiteren zeigen die in diesem Paragraphen beschriebenen Versuche, daß in der Tat alte sowie konzentriertere Extrakte nach schwacher oder kurzer Belichtung einen geringeren Peroxydasengehalt aufweisen als im Dunkeln gehaltene Lösungen. Gleichzeitig geht aber schon aus Versuch 40, 3 hervor, daß bei längerer, wenn auch schwacher Belichtung der Unterschied sich umkehrt. Ein weiterer Versuch hierfür ist der folgende; vielleicht noch überzeugendere werden im nächsten Paragraphen mitgeteilt werden.

Versuch 46 (P. IV. 98). Ein frischer Extrakt aus der Hämolymphe einer ausgewachsenen Cossus-Raupe wurde in ein verdunkeltes und in ein helles Röhrchen verteilt, beide im Wasserbad in die (schwache) Sonne gestellt. Es wurden stets gemischt

2 ccm E + 1 ccm W + 2 Tr Gu.

1. Nach 4 Stunden schwacher Sonne ergab sich bei Guajaczusatz kaum ein Unterschied; H war indessen mehr grünlichblau, D hingegen mehr bräunlichgrün, aber dunkler gefärbt. Nach 24 Stunden war $D \gtrsim H$ (**), obschon der Unterschied ziemlich klein war.

2. Die Extrakte wurden weitere 24 Stunden stehengelassen und erhielten während dieser Zeit ca. 6 Stunden Sonne. Die Probe ergab sofort $H > D$. Dabei war H schwach violettblau, D viel gelblichgrüner gefärbt. Nach 24 Stunden $H \geq D$ (**); H viel blauer als D.

3. Nach weiteren 24 Stunden, während welcher ca. 5 Stunden Sonne waren, wurde eine weitere Probe angestellt. Sofort $H \geq D$. H ist

violettblau, D mehr bräunlichgrün (**). Nach 24 Stunden derselbe Unterschied.

Versucht man diese Art der Lichtwirkung näher zu analysieren, so ist vor allem auf einen Umstand aufmerksam zu machen. Es handelt sich bei der relativen Verringerung des Peroxydasengehalts älterer Extrakte durch Belichtung nicht um eine direkte Zerstörung des Ferments, sondern vielmehr um eine Behinderung der natürlichen Vermehrung der Peroxydase, welche wahrscheinlich nur an die Gegenwart von Sauerstoff geknüpft ist. Denn wie bereits aus den in § 26 mitgeteilten Versuchen hervorgeht, findet sowohl im Hellen als auch im Dunkeln eine natürliche Vermehrung des Peroxydasengehalts statt, eine Vermehrung, die bei längerem Stehen auch in Gegenwart von Chloroform jedoch wieder einer Abnahme Platz macht. Dieses Absteigen findet nun, wie aus den Versuchen hervorgeht, bedeutend eher im Dunkeln als im Hellen statt, das Maximum des Peroxydasengehalts tritt also im Dunkeln viel früher ein. Auf der andern Seite zeigen die in § 29 beschriebenen Versuche, daß dieses Dunkelmaximum, verglichen mit dem entsprechenden Peroxydasengehalt schwach belichteter Extrakte, einen größeren absoluten Wert besitzt als diese. Die natürliche Vermehrung des Peroxydasengehalts findet also im Dunkeln schneller statt als bei schwacher Belichtung, vorausgesetzt, daß auch diese schwache Belichtung nicht zu lange dauert. Fig. 1 veranschaulicht schematisch dies Verhalten und gibt somit die bisherigen Resultate über den Einfluß der Belichtung auf den Peroxydasengehalt tierischer Extrakte in graphischer Form wieder.

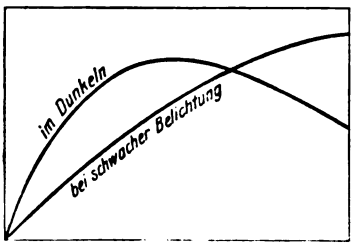


Fig. 1.

Zur Technik der in § 29 beschriebenen Versuche sei noch hervorgehoben, daß die Zugabe des Guajacs sowie des H_2O_2 stets in der Reihenfolge geschah, welche für das Resultat $D > H$ ungünstig war, d. h. in der Reihenfolge H, D. Das Wasserstoffperoxyd wurde stets in ca. $\frac{m}{50}$ Lösung verwendet.

§ 30. Auch der Einfluß der Wellenlänge des Lichtes ergab bei schwacher Belichtung usw. Resultate, welche den im vorigen Paragraphen beschriebenen entsprechen.

Versuch 47 (P. III. 33). Ein ca. 1 Tag alter Extrakt aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer wurde in vier Versuchsgläser verteilt, welche in der oben beschriebenen Weise hergerichtet worden waren. Sämtliche Gefäße wurden im Wasserbad etwa 10 Stunden lang von diffusem Tageslicht (April) belichtet. Hierauf wurden gemischt je

2 ccm E + 2 ccm W + 2 Tr Gu.

Leider verunglückte hierbei die Probe für den „Violett"-Versuch. Reihenfolge des Guajaczusatzes: H, D, G, V. Sofort erscheint G am dunkelsten, dann D und schließlich A, welch letzteres im Gegensatz zu der ziemlich rein blaugrünen Färbung von G und D einen mehr bräunlichgrünen Farbton hat. Nach Verdünnung mit Chloroformwasser und einstündigem Stehen sehr deutlich $G \geq D \geq H$ (**).

Versuch 47 (P. N. 40). Ein Extrakt aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer, welcher 1 Tag in diffusem schwachem Lichte gestanden hatte, wurde in entsprechende vier Versuchsröhren verteilt, die Röhren darauf in ein großes ca. 5 Liter fassendes Wasserbad gebracht und 21 Stunden auf dem Laboratoriumstisch (in der Nähe eines nach Osten gehenden Fensters) belassen. Die Röhren wurden ca. 8 Stunden von schwachem diffusem Lichte (Ende November) getroffen. Das Licht hatte bei diesem (wie übrigens auch bei allen anderen Versuchen) drei Glaswände und drei Flüssigkeitsschichten, von denen die äußerste hier ca. 20 cm dick war, zu durchstrahlen. Es wurden darauf gemischt je

2 ccm E + 2 Tr Gu + 2 ccm H_2O_2.

Nach einer halben Stunde war die Reihenfolge $D > H > V > G$, nach einer Stunde $D > V > G > H$ (**). Reihenfolge des Guajac- und H_2O_2-Zusatzes H, D, G, V.

Versuch 48 (P. N. 44). Ein frischer Darmextrakt hungernder Mehlwürmer wurde bei gleicher Versuchsanordnung 14 Stunden lang von Auerlicht belichtet. Die Belichtung war also abgesehen von der längeren Belichtungsdauer wesentlich schwächer als die in vorigem Versuch. Es wurden gemischt je

2 ccm E + 2 Tr Gu + 2 ccm H_2O_2.

Reihenfolge des Guajac- und H_2O_2-Zusatzes: H, D, G, V. Sofort ergab sich sehr deutlich: $G \geq D \geq H > V$ (**). Auch nach ca. 1 Stunde war die Reihenfolge dieselbe. Der Farbton der Gemische wies insofern auch Verschiedenheiten auf, als das ziemlich reine Blau von G und D bei H und V einem Blaugrün Platz machte.

Versuch 49 (P. N. 45). Zu gleicher Zeit wurde aus den in Versuch 48 benutzten Extrakten eine weitere Probe ohne H_2O_2-Zusatz angestellt. Reihenfolge des Guajaczusatzes wieder $H > D > G > V$. Sofort $G > D > H > V$; alle Gemische schwach gelblichgrün. Nach 1 Stunde: $G > D > V > H$; alle Gemische intensiv grün. Nach $1^1/_2$ Stunde: $G > D > V \sim H$ (**).

Es sei schon hier bemerkt, daß dieselben Extrakte, nachdem sie weiterhin zweimal je 8 Stunden diffusem Tageslicht ausgesetzt gewesen waren, 10 Minuten nach der Mischung die Reihenfolge ergaben: $V > H \geq D > G$, und zwar mit ganz ungewöhnlich großen Unterschieden. (Siehe Versuch 76.)

Aus den bisher geschilderten Versuchen über den Einfluß der Wellenlänge des Lichtes auf den Peroxydasengehalt tierischer Extrakte lassen sich im einzelnen noch nicht Gesetzmäßigkeiten ableiten, da, abgesehen von deren Unterschied $D > H$ die Reihenfolge von G und V eine ziemlich unregelmäßige ist, wenn schon nicht zu verkennen ist, daß G häufiger eine stärkere Färbung ergab als V, ja bei Versuch 48, 49 sogar am weitesten links, V dagegen am weitesten rechts steht. Dies Verhalten würde der Ähnlichkeit der Wirkungen von D und G auf der einen, H und V auf der andern Seite entsprechen, wie wir sie bei den Versuchen über die Lichtempfindlichkeit der Katalase fanden und wie sie auch für die phototropischen Wirkungen charakteristisch ist. Eine genauere Analyse indessen der Wellenlängeneinflüsse war nur möglich durch eine Serie von Beobachtungen, welche sich auf längere Versuchszeiten erstreckten. Außerdem wählte ich als Lichtquelle künstliches Licht (Auerlicht), welches einigermaßen konstant ist. Die folgenden Versuche sind zwei derartige Beobachtungsserien.

Versuch 50 (P. N. 49). Es wurde ein frischer Extrakt aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer hergestellt und in die entsprechend hergerichteten Versuchsgefäße verteilt. Großes Wasserbad; Auerlicht. Es wurden stets gemischt

1 ccm E + 2 ccm W + 1 Tr Gu + 1 ccm H_2O_2.

Reihenfolge des Guajac- und H_2O_2-Zusatzes stets normal, d. h. H, D, G, V.

1. 1 Stunde Belichtung. Nach 5 Minuten $D \geq H \sim G > V$; nach 25 Minuten $D > H > G > V$ (*).

2. 2 Stunden Belichtung. Nach 10 Minuten $D \gtrsim H > V > G$; nach 20 Minuten $D > H > V \gtrsim G$. Nach 16 Stunden jedoch $D > H > G > V$. Alle Proben unter 2 sind nach 20 Minuten deutlich blauer als die unter 1 (**).

3. 3 Stunden Belichtung. Sofort D am dunkelsten, V am hellsten. Nach 10 Minuten $D > H > G \gtrsim V$ Dieselbe Reihenfolge nach 20 Minuten. Nach 16 Stunden $D > H > G > V$ (*).

4. $17^1/_2$ Stunden Belichtung. Es ist bemerkenswert, daß alle vier Lösungen sehr gleichmäßig blau gefärbt sind, so daß während der ersten 15 Minuten kaum ein Unterschied wahrgenommen werden kann.

Nach 15 Minuten $D \gtrsim G \gtrsim H \gtrsim V$. Abgesehen von $D > V$ sind die Unterschiede sehr gering. Nach 30 Minuten $G \gtrsim D > H > V$; nach 9 Stunden ebenfalls: $G > D \sim H > V$ (**).

5. 26 Stunden Belichtung. Nach 5 Minuten $G \geq V \geq D \gtrsim H$; sehr kräftige Unterschiede. Nach 10 Minuten $G \geq V \geq H > D$; nach 20 Minuten $G \geq H \gtrsim V \geq D$; nach 40 Minuten $G > H > V \geq D$. Nach 15 Stunden $G > H > V > D$. H und auch D sind grüner als V und G (**).

6. $41^1/_2$ Stunden Belichtung, Nach 5 Minuten $V \geq H \gtrsim D \geq G$; nach 10 Minuten $H \sim V \geq D \geq G$; nach 20 Minuten $H \geq V \sim D \geq G$. Nach 4 Stunden $H \geq V \sim D > G$ (**).

7. 56 Stunden Belichtung. Nach 10 Minuten $V > H \gtrsim G \geq D$; nach 20 Minuten $V > H \gtrsim G \geq D$; nach 30 Minuten $H \gtrsim V > G \geq D$ (**). Bleibt so während der nächsten Stunden.

Versuch 51 (P. N. 52). Ein ca. 3 Tage alter Extrakt aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer wurde verwendet. Großes Wasserbad; Auerlicht. Es wurden stets gemischt

1 ccm E + 2 ccm W + 1 Tr Gu + 1 ccm H_2O_2.

Reihenfolge des Guajac- und H_2O_2-Zusatzes stets normal.

1. 17 Stunden Belichtung. Nach 5 Minuten $D \gtrsim G \geq V \geq H$; nach 10 Minuten $D > G > V > H$. Bleibt so während der nächsten Stunden (*).

2. 42 Stunden Belichtung. Nach 10 Minuten deutlich $V \geq G \sim D > H$; nach 20 Minuten $V > D \sim H \gtrsim G$; nach 30 Minuten $V > D \sim H \gtrsim G$. Nach $2^1/_2$ Stunden dasselbe (*).

3. 48 Stunden Belichtung. Nach 10 Minuten $V \geq H > G > D$; nach 20 Minuten $V > H \sim G > D$; nach 30 Minuten $V > H \sim G \gtrsim D$ (*). Nach 24 Stunden Stehen im Dunkeln jedoch deutlich $V > H > D > G$ (**). Auch noch nach 48 Stunden außerordentlich deutlich (*).

4. Nach 72 Stunden Belichtung. Nach Guajaczusatz (zunächst ohne H_2O_2) sofort $V > H \geq D \geq G$ in bezug auf Dunkelheit (*). Nach H_2O_2-Zusatz nach 20 Minuten $V > G > D > H$ (?) (*). Nach 20 Stunden Stehen dagegen sehr ausgesprochen $V > H \geq D > G$ (**).

Tabelle 33 gibt die Resultate dieser zwei Versuche in Tabellenform. Es sind dabei diejenigen Ergebnisse gewählt, welche erhalten wurden, nachdem die Guajacproben längere Zeit im Dunkeln gestanden hatten. Wie oft bemerkt wurde und übrigens aus den wiedergegebenen Versuchsprotokollen hervorgeht, ist oft noch während der ersten halben Stunde der Einfluß der Reihenfolge des Guajac- und H_2O_2-Zusatzes zu bemerken, so daß erst nach längerem Stehen konstante Unterschiede erhalten werden.

Tabelle 33.

Frischer Extrakt		3 Tage alter Extrakt	
Belichtungsdauer in Stunden	Intensität der Färbung	Belichtungsdauer in Stunden	Intensität der Färbung
1	$D > H > G > V$		
2	$D > H > V \gtrsim G$		
3	$D > H > G > V$		
$17^1/_2$	$G > D \sim H > V$	17	$D > G > V > H$
26	$G > H > V > D$		
$41^1/_2$	$H \geq V \sim D > G$	42	$V > D \sim H \gtrsim G$
56	$H \gtrsim V > G \geq D$	48	$V > H > D > G$
		72	$V > H \geq D > G$

Trotz einiger Unregelmäßigkeiten im einzelnen zeigen beide Versuchsreihen folgende Gesetzmäßigkeiten.

Während der ersten Zeit der Belichtung besteht regelmäßig der schon in den früher beschriebenen Versuchen gefunden Unterschied $D > H$. Beim frischen Extrakt wird nach $17^1/_2$ Stunden der Unterschied fraglich und hat sich nach 26 Stunden zu $H > D$ umgekehrt. Beim alten Extrakt dagegen wird der Unterschied $D > H$ erst nach 42 Stunden fraglich und wandelt sich erst bei 48 Stunden in den entgegengesetzten $H > D$ um. Es ergibt sich also auch aus diesen mit sehr schwacher Belichtung angestellten, lange dauernden Versuchen, daß die „negative" Lichtwirkung viel länger bei alten als bei frischen Extrakten andauert.

Weiterhin zeigt sich, daß während der ersten 3 (wahrscheinlich auch während der ersten 5 bis 10) Stunden D und H eine Sonderstellung einnehmen insofern, als sich hier die Peroxydase stärker vermehrt als unter farbigem Lichte. Daß unter allen Belichtungsbedingungen eine Vermehrung des Peroxydasengehalts der Extrakte stattfindet, geht daraus hervor, daß sämtliche Extrakte nach 2 Stunden eine stärkere Reaktion ergaben als nach 1 Stunde.

Nach 14 bis $17^1/_2$ Stunden zeigt sich übereinstimmend in allen Versuchen (siehe auch Versuch 47 und 48) eine Trennung derart, daß diejenigen Belichtungsbedingungen, welche sich bei den Katalaseversuchen als gleichartig erwiesen haben, sich auch

hier zusammengruppieren. Auf der einen Seite finden wir D und G, auf der andern H und V. Dabei findet unter D und G eine stärkere Peroxydasenvermehrung statt als bei H und V.

Nach ca. 26stündiger Belichtung findet nun eine komplizierte Verschiebung statt insofern, als G und D nach rechts verschoben werden, resp. V und H nach links vorrücken. Bei den Versuchen mit frischen Extrakten (48, 49 und 50) bleibt stets G am weitesten links, wahrend D zuerst abfällt, d. h. es findet hier unter G die stärkste Vermehrung resp. die geringste gleichzeitige Zerstörung statt. Bei den Versuchen mit alten Extrakten findet sich einmal $G > D$, und einmal $D > G$. — Bei den frischen Extrakten findet diese Verschiebung zwischen 26 und $41^1/_2$ Stunden Belichtung statt, bei den alten ist sie dagegen nach 42 Stunden noch nicht, sondern erst nach 48 Stunden vollendet. Nach dieser Zeit hat die „positive" Wirkung der Belichtung die Oberhand, wie sie dies bei intensiverem Licht sofort zu tun pflegt, ein Verhalten, das weiter unten geschildert werden wird.

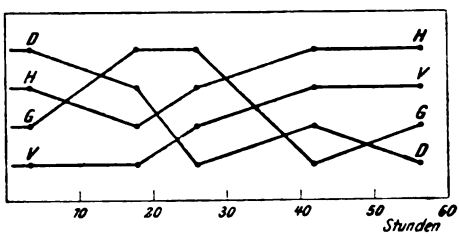


Fig. 2.

Eine graphische Darstellung dieser Resultate zeigen Fig. 2 und 3. In Fig. 2, welche die Veränderungen frischer Extrakte darstellt, gehen H und V einigermaßen parallel, während G ganz abweichend ein Maximum, D dagegen ein Minimum hat. Dies Verhalten ist nicht nur bei dem graphisch dargestellten Versuch zu beobachten, sondern findet sich vielmehr auch in den unabhängigen Versuchen 46, 48, 49 insofern, als auch hier in den Zeiten 10 und 14 Stunden $G > D$ ist. Es durchkreuzen sich mit andern Worten die Kurven für G und D bei frischen Extrakten.

Bei alten Extrakten (Fig. 3) gehen hingegen die zugeordneten Belichtungsbedingungen H und V sowie D und G unter sich parallel und schneiden sich deutlich paarweise. Auch hier ist das Verhalten nicht nur für einen Versuch charakteristisch, sondern auch in Versuch 47, bei welchem natür-

liches diffuses Licht, welches zweifellos stärker war als das Auerlicht, verwendet wurde, ergab sich die Reihenfolge $D > V > G > H$. Diese Reihenfolge würde aber vollständig dem durch die gestrichelte Senkrechte in Fig. 3 bezeichneten Schnitt durch alle vier Kurven entsprechen, vorausgesetzt, daß die Überschneidung der Kurven etwas weiter nach links, d. h. an einen früheren Zeitpunkt verlegt werden könnte. Diese Annahme ist aber insofern durchaus zulässig, als das natürliche diffuse, in Versuch 47 verwandte Licht zweifellos heller war als Auerlicht, die Überschneidung der Kurven oder, was das gleiche bedeutet, das Überhandnehmen der „positiven" Lichtwirkung über die „negative", bei größerer Lichtintensität aber gemäß den obigen und noch zu beschreibenden Versuchen schneller vor sich geht.

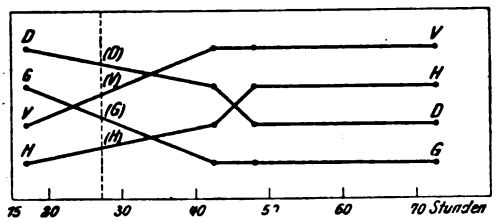


Fig. 3.

§ 31. Über die nähere chemische Natur dieser mannigfaltigen „negativen" Lichtwirkungen auf frische und alte Peroxydaselösungen bin ich einstweilen nicht imstande, irgendwelche sichere Vermutungen anzustellen. Das einzige, was sich nach vielfachen Versuchen mit Sicherheit resp. Reproduzierbarkeit ergeben hat, ist die Tatsache, daß diese negativen Wirkungen nur bei schwachen Lichtintensitäten stattfinden, bei stärkeren, wie aus den nächsten Paragraphen hervorgehen wird, jedoch entweder nur in den ersten Minuten eine Rolle spielen oder aber überhaupt wegfallen. Offenbar können bei schwachen Lichtintensitäten noch chemische Vorgänge hervortreten und die „negativen" Lichtwirkungen ermöglichen, die bei stärkerer Intensität ausgeschlossen sind. Welcher Natur diese ersteren Vorgänge sind, darüber haben erst weitere Untersuchungen Aufklärung zu bringen.

Ferner erinnert dies Verhalten der Peroxydasenextrakte bei schwacher Belichtung an die kurze anfängliche Vermehrung des Katalasengehaltes lebender Porthesiaräupchen. Indessen ist für dieses Anwachsen, wie oben erörtert wurde, zweifellos zum

größeren Teile die Erhöhung der Temperatur, die zuweilen fast 10° betrug, verantwortlich zu machen. Dieser letztere Umstand kommt hier indessen nicht in Betracht, da die verwendeten Tiere nicht wie die Porthesiaräupchen im Kalten, sondern bei derselben Temperatur gehalten wurden wie die Extrakte selbst. Auch die eventuelle geringe Temperaturerhöhung durch anhaltende Belichtung, die aber durch ein großes Wasserbad und Wasserwechsel äußerst eingeschränkt worden war, kann kaum hier eine Rolle spielen, namentlich wenn man bedenkt, daß bekanntlich der Temperaturkoeffizient photochemischer Reaktionen meist kleiner als der normale rein chemische ist. Dieser Schluß ist selbst dann noch gültig, wenn man annimmt, daß für monochromatisches Licht entsprechend den oben angeführten Versuchen von Trautz und Thomas der photochemische Temperaturkoeffizient wieder einen normalen Wert erreicht.

§ 32. Zusammenfassung. Die wichtigsten Resultate der in § 29, 30 und 31 geschilderten Versuche sind folgende.

Bei geringen Intensitäten (schwaches diffuses natürliches Licht und Auerlicht) übt das Licht Wirkungen aus, welche die natürliche Vermehrung peroxydasehaltiger Extrakte in Gegenwart von Sauerstoff hindern. Diese „negativen" Lichtwirkungen sind stärker bei alten und konzentrierten Extrakten als bei frischen und verdünnteren, resp. dauern länger bei ersteren als bei letzteren. (Bei längerer Versuchsdauer findet eine Umkehrung der „negativen" zu „positiven" Lichtwirkungen statt, welch letztere in den folgenden Paragraphen behandelt werden. Frische Extrakte zeigen diese Umkehr nach kürzerer Belichtung als alle.) Wie aus speziellen Versuchen (siehe auch § 26) hervorgeht, handelt es sich bei diesen „negativen" Lichtwirkungen nicht um eine Zerstörung der Peroxydase, sondern um eine Verlangsamung derjenigen Reaktionen, welche bei Gegenwart von Sauerstoff zu einer Vermehrung der Peroxydase führen (Fig. 1).

Der „negative" Einfluß der Wellenlänge des Lichts bei schwachen Intensitäten ist ebenfalls von der Belichtungsdauer abhängig, indem bei längerer Belichtung ebenfalls „positive" Lichtwirkungen an Stelle der „negativen" treten. Während der ersten Belichtungsstunden (Auerlicht) hinderte gelbes

und violettes Licht noch stärker als gemischtes. Hierauf begünstigt in späteren Stadien gelbes Licht stärker die Peroxydasenbildung als violettes, ja bei frischen Extrakten sogar stärker als Dunkelheit und gemischtes Licht. Früher bei frischen als bei alten Extrakten werden sodann die Einflüsse farbigen Lichtes einander entgegengesetzt, insofern als Violett wie gemischtes Licht fördernde „positive" Wirkungen, Gelb dagegen wie Dunkelheit hindernde oder „negative" Wirkungen auf den Peroxydasengehalt der Extrakte ausübt. Nähere Einzelheiten dieser ziemlich komplizierten Verhältnisse sind in den beschriebenen Versuchen einzusehen. (Hierzu Fig. 2 und 3.) — Es werden einige Einwände gegen die Eindeutigkeit dieser Resultate, fernerhin einige sehr allgemeine Vermutungen über die chemische Natur der negativen Lichtwirkungen erörtert.

§ 33. In den folgenden Paragraphen soll über Versuche berichtet werden, welche entweder mit direktem Sonnenlicht oder doch mit hellem diffusem Tageslicht angestellt worden sind. Diese Versuche ergaben nur Resultate, welche schon in den vorigen Paragraphen angedeutet und als „positive" Lichtwirkungen bezeichnet wurden. Da ich im Anfang dieser Untersuchung fast ausschließlich mit direktem Sonnenlicht arbeitete, wurde ich mit diesen Wirkungen des Lichts zuerst bekannt, und hielt sie zunächst für die einzigen oder doch reproduzierbaren, bis mehrere Versuche mit unerwarteten Resultaten mich die bisher beschriebenen „negativen" Lichtwirkungen kennen lehrten.

Diese „positiven" Lichtwirkungen bestehen darin, daß Extrakte nach intensiver, allerdings nicht beliebig langer Belichtung einen größeren Peroxydasengehalt zeigten als unter gleichen Bedingungen gehaltene, aber verdunkelte Extrakte. Schon im vorigen Paragraphen wurden sodann einige Versuche angeführt, welche zeigten, daß auch bei schwächerer Belichtung „positive" Lichtwirkungen auftreten, vorausgesetzt, daß die Belichtung lange genug dauerte.

Einige Versuche über die Wirkung direkten Sonnen- oder sehr hellen diffusen Lichtes sind im folgenden beschrieben, wobei die Auswahl so getroffen wurde, daß für möglichst verschiedene Extrakte und Bedingungen Beispiele gegeben wurden. Ich beginne mit einem orientierenden Versuch.

Versuch 52 (P. IV. 86). Ein frischer Extrakt aus dem Darm eines hungernden, überwinternden Dytiscus wurde in ein verdunkeltes und in zwei helle Röhrchen gegeben. Das eine der hellen Röhrchen (S) wurde zusammen mit dem verdunkelten (D) im Wasserbad an einen Platz gestellt, der während zweier Tage täglich ungefähr 6 Stunden von der Sonne beschienen wurde. Das zweite helle Röhrchen (H) wurde ebenfalls in ein Wasserbad getan, aber an eine Stelle des Zimmers gestellt, welche zwar ebenfalls am Fenster lag, nie jedoch von direkter Sonne getroffen wurde (März). Nach zweitägigem Stehen wurde gemischt je

2 ccm E + 1 ccm W. + 2 Tr Gu.

Nach kurzer Zeit ergab sich $S > H > D$; diese Reihenfolge blieb auch nach 48stündigem Stehen dieselbe. Bemerkenswerterweise war D viel grüner gefärbt als S und H (*).

Versuch 53 (P. IV. 79). Ein frischer Extrakt aus dem Darminhalt eines überwinternden, hungernden Hydrophilus wurde in ein verdunkeltes und in ein helles Gefäß gegeben, beide Gefäße wurden im Wasserbad der ziemlich kräftigen Sonne (März) ausgesetzt. Es wurden stets gemischt

2 ccm E + 2 Tr Gu.

1. Nach 30 Minuten wurde die erste Probe angestellt. Sofort ergab sich $H > D$, wenn schon der Unterschied nicht sehr groß war (**). Unterschied bleibt in den nächsten Stunden.

2. Nach insgesamt 4 Stunden Belichtung, von denen allerdings nur $2^1/_2$ Sonne waren, wurde eine zweite Probe angestellt, ebenfalls mit dem Resultat $H > D$ (*).

3. Nach 24 Stunden, während welchen die Extrakte ca. 3 Stunden Sonne und 7 Stunden diffuser Belichtung ausgesetzt gewesen waren, ergab eine dritte Probe wiederum $H \geq D$ (*). Dieser letzte Unterschied war viel schlagender als die vorhergehenden.

Versuch 54 (P. N. 30). Ein frischer Dytiscus-Hämolymphe-Extrakt wurde teilweise verdunkelt, teilweise belichtet. Sonne. Es wurden gemischt

1 ccm E + 2 ccm H_2O_2 + 2 Tr Gu.

Nach fünf Minuten Belichtung ergab sich sofort $H > D$ (**). H ist bedeutend grüner und dunkler als D. Unterschied bleibt nach 1 Stunde.

Versuch 55 (P. N. 32). Derselbe Extrakt wurde 4 Stunden später in zwei Röhrchen verteilt, welche mit Auerlicht beleuchtet wurden. Es wurden gemischt

1 ccm E + 2 ccm H_2O_2 + 2 Tr Gu.

Nach fünf Stunden Belichtung ergab die Probe auch nach 15 Minuten Stehen kaum einen Unterschied; höchstens erscheint H sehr wenig grüner als D (**). Nach ca. 1 Std. $H \gtrsim D$ (?).

Versuch 56 (P. N. 33). Ein anderer frischer Dytiscus-Extrakt wurde in ein verdunkeltes und in ein helles Röhrchen gegeben und beide im Wasserbad in die kräftige Sonne gestellt. Es wurden gemischt

1 ccm E + 1 ccm H_2O_2 + 1 Tr Gu.

Nach fünf Minuten ergibt die Probe wiederum $H > D$ (**). Der Unterschied ist zwar nicht übermäßig groß, doch vollkommen eindeutig: H grüner und dunkler als D. Nach 6 Stunden Stehen im Dunkeln prachtvoller Unterschied $H \geq D$ (***).

Versuch 57 (P. N. 36). Von dem in Versuch 57 benutzten Extrakt wurde eine größere Menge in zwei Kölbchen verteilt, so, daß der Extrakt eine große Oberfläche besaß. Eins der Röhrchen wurde mehrmals dicht mit Stanniol umwickelt, beide verkorkt, mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und im Wasserbad zwei Tage lang belichtet. Die Gefäße waren während dieser Zeit insgesamt ca. 10 Stunden Sonne ausgesetzt. Es wurden gemischt

$$1 \text{ ccm } E + 1 \text{ ccm } H_2O_2 + 1 \text{ Tr Gu.}$$

Nach 15 Minuten war zunächst kaum ein Unserschied festzustellen, namentlich da beide Gemische ziemlich blau waren (**). Nach 25 Minuten jedoch deutlich $H > D$. Nach ca. 1 Stunde prachtvoller Unterschied $H \geq D$ (***); H ganz tief undurchsichtig dunkelblau, während D durchscheinend hell grünblau ist. Einer der größten von mir beobachtetenn Unterschiede.

Versuch 58 (VI. 16). Ein „Normalextrakt" von im Dunkeln und Kühlen gehaltenen Porthesia-Räupchen wurde in ein verdunkeltes und in ein helles Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden im Wasserbad zirka eine Woche lang dem hellen, diffusen Lichte (einschließlich vielleicht 4 Stunden Sonne) ausgesetzt. Hierauf wurden gemischt je

$$2 \text{ ccm } E + 2 \text{ Tr Gu.}$$

Die Proben standen über Nacht, da sofort weder eine Färbung noch ein zweifelsfreier Unterschied nachzuweisen war. Am nächsten Morgen war ein außerordentlich kräftiger Unterschied $H \geq D$ (**) zu bemerken. Nach 3 Tagen, während welchen die Proben schwachem diffusem Tageslicht ausgesetzt gewesen waren, waren beide Proben stark verblichen, dabei aber H stärker als D, so daß $D > H$ war (*). Siehe hierzu § 36.

Versuch 59 (VI. 5). Es wurde ein „Normalextrakt" aus getrockneten Porthesia-Räupchen hergestellt, ein Teil derselben verdunkelt, ein anderer belichtet. Beide Röhrchen wurden im Wasserbad 5 Tage lang belichtet, wobei sie fast täglich ca. 6 Stunden direktes Sonnenlicht erhielten. Es wurden gemischt je

$$2 \text{ ccm } E + 2 \text{ ccm } W + 2 \text{ Tr Gu.}$$

Nach 5 Minuten erscheint H etwas (wenig) bläulicher als D (*); D ist dabei mehr bräunlichgrün. Beide Proben wurden sodann in die Sonne gestellt (vergleiche hierzu § 37). Bereits nach 10 Minuten $H \geq D$ (**); D grünlichgelber als H, welches blaugrün ist. Nach einer Stunde sehr kräftiger Unterschied $H \geq D$ (**); H stark dunkelblau, D schwach gelblichgrün. Nach 24 Stunden Unterschied $H > D$ (**) immer noch sehr deutlich, obgleich H sichtlich auszubleichen beginnt.

Versuch 60 (P. N. 9). Es wurde ein Extrakt aus getrockneten Porthesiaräupchen hergestellt, in ein verdunkeltes und in ein helles Röhr-

chen verteilt und im Wasserbad in die ziemlich schwache Sonne gestellt. Es wurden nach 3 Stunden Sonne gemischt je

2 ccm E + 1 ccm H_2O_2 + 2 Tr Gu.

Nach 20 Minuten waren beide Extrakte noch gelblichbraun, indessen hatte H deutlich eine leise Grünfärbung. Nach zirka einer Stunde H > D, d. h. sowohl grüner als dunkler. D ließ kaum eine Spur von Grün erkennen (*).

Versuch 61 (P. N. 39). In diesem wie in den folgenden Versuchen wurden Extrakte aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer verwendet („Mehlwurm-Extrakt"). Ein frischer Extrakt wurde während 28 Stunden mit 2 Stunden direkte, kräftige Sonne (November) und ca. 9 Stunden diffusem, aber ebenfalls starkem Tageslicht belichtet. Es wurden gemischt zunächst je

2 ccm E + 2 ccm W + 2 Tr Gu.

Sofort war H tief grünblau, während D gelblichbräunlich und milchig war. Hierauf wurde zu jedem Gemisch 1 ccm H_2O_2 zugesetzt. Sofort außerordentlich starker Unterschied: H ≥ D. H tiefblau, D nur grünlich (**).

Versuch 62 (P. N. 47). Untersucht wurde ein anderer frischer Mehlwurmextrakt in hellem diffusem Licht. Gemischt wurden immer je

2 ccm E + 1 Tr Gu + 1 ccm H_2O_2.

1. Nach 1 Stunde Sonne. Sofort H ≥ D; sehr kräftiger Unterschied (**).

2. Nach $1^1/_2$ Stunde Sonne. Nach 10 Minuten ebenfalls deutlich H > D (**).

3. Nach weiteren 25 Stunden, während welchen die Extrakte ca. 8 Stunden hellem diffusem Tageslicht ausgesetzt gewesen waren, wurde eine weitere Probe angestellt. Nach 10 Minuten beide Gemische kräftig blau, aber deutlich H > D (*).

4. Nach weiteren 24 Stunden, während welchen die Extrakte zirka 7 Stunden hellem diffusem Tageslicht und ca. 1 Stunde schwacher Sonne ausgesetzt gewesen waren, ergab eine Probe nach 5 Minuten D ∼ H, nach 10 Minuten jedoch H > D, nach 20 Minuten sehr deutlich H ≥ D (**).

Versuch 63 (P. N. 46). Gleichzeitig mit Versuch 60, und unter denselben Belichtungs- usw. Bedingungen wurde ein Versuch mit einem ca. 2 Tage alten Mehlwurmextrakte angestellt.

1. Nach 1 Stunde Sonne. Nach 10 Minuten sehr geringer Unterschied, vielleicht H ≳ D. Nach 20 Minuten H ≳ D (**).

2. Nach $1^1/_2$ Stunden Sonne. Sofort H ≳ D. Nach 20 Minuten sehr deutlich H > D (**).

3. Nach weiteren 25 Stunden unter denselben Belichtungsbedingungen wie 60, 3 ergab die Probe nach 10 Minuten H > D (*).

4. Nach weiteren 24 Stunden unter denselben Belichtungsbedingungen wie 60, 3 ergab sich nach 5 Minuten D > H, deutlich (**). Nach zehn Minuten aber H ∼ D und nach 20 Minuten sehr deutlich H ≥ D (**).

Die Ursache für die Umkehr des anfänglichen Unterschieds nach 10 bis 20 Minuten in Versuch 60 und 61, 4, liegt darin, daß hier wie in allen in § 31 geschilderten Versuchen der Guajac- und H_2O_2-Zusatz in der Reihenfolge D, H geschah.

Weiterhin ist zu Versuch 60 und 61 hinzuzufügen, daß alle Unterschiede in Versuch 60 (mit frischem Extrakt) deutlicher waren als in Versuch 61 (mit altem Extrakt).

Versuch 64 (P. N. 53). Ein frischer Mehlwurmextrakt wurde in helles diffuses Tageslicht gestellt. Es wurden gemischt je

1 ccm E + 1 ccm W + 1 Tr Gu + 1 ccm H_2O_2.

1. Nach 1 Stunde Belichtung. Sofort deutlich $H > D$, nach zehn Minuten $H \geq D$, nach 4 Stunden dasselbe (*).

2. Nach weiteren 3 Stunden schwacher, diffuser, natürlicher und 2 Stunden Belichtung durch einen Auerbrenner ergab sich sofort $H \geq D$ (*). Derselbe Unterschied war auch nach 20 Minuten und auch noch nach 24 Stunden vorhanden (**).

3. Nach weiteren 26 Stunden ununterbrochener Belichtung mit Auerlicht ergab sich: nach 5 Minuten $H \gtrsim D$, nach 10 Minuten und später $H > D$ (**).

Versuch 65 (P. N. 54). Derselbe Extrakt. welcher in Versuch 62 untersucht wurde, wurde ca. auf $^1/_5$ verdünnt und unter ganz gleichen Bedingungen in demselben Wasserbad gleichzeitig mit den in Versuch 62 verwendeten Extrakten belichtet. (NB. wurde ebenfalls gleichzeitig Versuch 42 [§ 29] mit altem Extrakt, welcher bei denselben Bedingungen den Unterschied $D > H$ ergab, angestellt.) Proben wurden gleichzeitig und in gleicher Weise ausgeführt.

1. Nach 1 Stunde Belichtung. Sofort $H > D$, auch nach zehn Minuten (*).

2. Nach weiteren 4 Stunden Belichtung (siehe Versuch 62, 2). Sofort $H \geq D$; sehr starker Unterschied. Ebenfalls nach 20 Minuten und 24 Stunden $H \geq D$ (**). Unterschied kräftiger als bei Versuch 62, 2.

3. Nach weiteren 26 Stunden Belichtung (siehe Versuch 62, 2) ergab sich: nach 5 Minuten $D \gtrsim H$, nach 10 Minuten $D > H$ (**), nach 24 Stunden jedoch kein bemerkbarer Unserschied (**). Beide Proben sehr blaß bläulich.

Versuch 66 (P. IV. 75). Um den Einfluß der Konzentration des Extrakts auf die „positiven" Lichtwirkungen zu studieren, wurden in einem kleinen Meßzylinder folgende Mischungen hergestellt, wobei der Körperextrakt (siehe Versuch 43) eines Dytiscus verwendet wurde:

1.	6	Tr	E + W;	zusammen	10 ccm.
2.	16	„	„	„	10 „
3.	28	„	„	„	10 „
4.	40	„	„	„	10 „
5.	60	„	„	„	10 „

Selbstverständlich kam hierbei stets dieselbe Tropfpipette zur Verwendung. Diese Mischungen wurden darauf zur Hälfte in ein verdunkeltes, zur Hälfte in ein helles Röhrchen gegeben, worauf sie eine halbe Stunde mit recht hellem Tageslicht (März) belichtet wurden. Es ergab sich sofort nach Zusatz von je 2 Tr Gu:

1. $H \geq D$, sehr deutlich,
2. $H \geq D$, „
3. $H > D$, deutlich,
4. $H \gtrsim D$, schwach,
5. $H \sim D$, „

Derselbe Unterschied war auch nach 24 Stunden zu beobachten (**).

Aus Versuch 62, 2, 63, 2 und 64 geht also hervor, daß im allgemeinen verdünntere Lösungen bei Belichtung im Verhältnis zu Dunkelextrakten stärkere „positive" Lichtwirkungen zeigen als konzentriertere, in ähnlicher Weise wie dies frische Extrakte im Vergleich mit alten tun. Andererseits geht aber aus Versuch 62, 3 und 63, 3 hervor, daß bei längerer Belichtung verdünnte Extrakte eher die Erscheinungen der endgültigen Zerstörung der Peroxydase, wie sie trotz Chloroformzusatz bei allen Extrakten bei Zimmertemperatur und in Gegenwart von Sauerstoff nach und nach eintritt, zeigen. Über diese definitive und irreversible Zerstörung aller Extrakte unter beliebigen Belichtungsbedingungen wird später noch einiges gesagt werden.

Weiterhin sollen noch einige Versuche wiedergegeben werden, welche das Verhalten von Lösungen bei schwächerem diffusem Tageslicht und intensiverem künstlichem Licht illustrieren und unter diesen Bedingungen Übergangserscheinungen zwischen den „negativen" und „positiven" Lichtwirkungen aufweisen.

Versuch 67 (P. I. 3). Ein frischer Mehlwurmextrakt wurde in ein verdunkeltes und in ein helles Röhrchen verteilt. Die Röhrchen standen über Nacht (ca. 14 Stunden) im Dunkeln und waren darauf 5 Stunden hellem diffusem Morgenlicht ausgesetzt (Februar). Es wurden gemischt je

5 ccm E + 2 Tr Gu.

Sofort nach Guajaczusatz $H > D$ (*). Nach ca. 10 Minuten sehr stark $H \geq D$ (*). Nach 2 und 3 Stunden Stehen Unterschied $H \geq D$ ganz ungewöhnlich groß: H tiefblau, D nur schwach. weißlichblau (*).

Es zeigt sich also, daß helles, diffuses Morgenlicht ähn-

liche Wirkungen wie direktes Sonnenlicht hervorrufen kann, ein Resultat, welches der auch sonst von mir gemachten Erfahrung entspricht, daß sich „positive" Lichtwirkungen oft sogar leichter in den Vormittags- als in den Mittagsstunden erhalten lassen. Hierfür sind mit viel Wahrscheinlichkeit die Verschiedenheiten der Zusammensetzung des Morgen- und Mittagslichtes verantwortlich zu machen.

Ein einziges Mal gaben mir auch zwei gleichzeitig angestellte Versuche mit Auerlicht einwandfreie „positive" Lichtwirkungen. Charakteristischerweise handelte es sich hierbei um verdünnte und frische Extrakte.

Versuch 68 und 69 (P. III. 68 und 69). Dytiscus-Hämolymphe-Extrakt. Es wurden gemischt

1. 2mal 1 ccm E + 2 ccm W,
2. 2mal 3 Tr E + 2 ccm W.

Nach 6 Stunden Belichtung mit Auerlicht wurden zu allen vier Gemischen 2 Tropfen Guajac gegeben.

1. Nach 20 Minuten H > D, nach 30 Minuten derselbe Unterschied deutlicher; nach 1 Stunde H > D (**).

2. Bereits nach 10 Minuten deutlich H > D (**), nach 20 Minuten sehr deutlich H > D; ebenso nach 1 Stunde.

Auch der Einfluß der Konzentration geht wieder deutlich aus diesen Versuchen hervor.

Endlich möchte ich der Vollständigkeit halber noch einen Versuch anführen, bei welchem die Extrakte, trotzdem sie wenigstens zeitweise der Sonne ausgesetzt gewesen waren, eine „negative" Lichtwirkung aufwiesen. Es handelt sich dabei um einen Versuch, bei welchem infolge von starkem Wind und bewölktem Himmel in äußerst unregelmäßiger Weise schwacher Sonnenschein mit sehr schwachem diffusem Licht abwechselte.

Versuch 70 (P. N. 8). Mehlwurmextrakt. Die Röhrchen wurden 3 Stunden belichtet. Darauf gemischt je

1 ccm E + 1 ccm W + 1 Tr Gu + 1 ccm H_2O_2.

Zunächst kein Unterschied, beide bläulich. Nach ca. 10 Minuten erscheint D dunkler und stärker gefärbt als H (*). Nach ca. 1 Stunde D dunkelgrün, während H zwar deutlich blauer, aber viel heller und durchsichtiger ist.

§ 34. Der Einfluß der Wellenlänge des Lichtes auf die „positiven" Lichtwirkungen geht schon aus einigen Versuchen in § 30 hervor insofern, als bei größerer Versuchsdauer unter

schwacher Belichtung dieselben „positiven" Lichtwirkungen auftreten, welche intensive Beleuchtung, z. B. direktes Sonnenlicht, nach sehr kurzer Belichtung hervorzurufen vermag. Beispiele für letztere Wirkungen geben folgende Versuche.

Versuch 71 (P. III. 34 I). Von einem frischen Mehlwurmextrakt wurden je 1 ccm + 1 ccm W in 4 entsprechend vorgerichtete Versuchsröhren gegeben und im Wasserbad 3 Stunden der Sonne ausgesetzt. Hierauf wurden in normaler Reihenfolge (H, D, G. V) je 2 Tropfen Guajac dazugegeben. Nach 10 Minuten zunächst nur H und V dunkler als D und G; zwischen H und V kaum ein Unterschied, G erscheint ein wenig dunkler als D. Nach 20 Minuten ist V dunkler als H, und zwar ist V tief blaugrün gefärbt, während H zwar reiner blau, aber viel heller und milchig gefärbt ist. G ist ähnlich wie H blauer, aber viel heller und milchiger als D. Nach ca. 1 Stunde jedoch zweifellos $V > H \geq D > G$ (**).

Versuch 72 (P. III. 46). Bei einem andern Versuch wurde ein ca. 2 Tage alter Mehlwurmextrakt verwendet. Die Gefäße standen ca. 12 Stunden (über Nacht) im Dunkeln und waren darauf 6 Stunden Morgen- und Vormittagssonne (März) ausgesetzt. Es wurden gemischt je

2 ccm E + 2 Tr Gu.

Nach 10 Minuten V am dunkelsten, obgleich H blauer aber heller erscheint. G bei weitem am wenigsten, nämlich nur weißlich grüngelb gefärbt (*).

Nach 30 Minuten H und V am blauesten und dunkelsten, dann G, dann D (**).

Nach ca. 2 Stunden $H \sim V \geq G > D$ (**).

Versuch 73 (P. IV. 51). Untersucht wurde ein frischer Extrakt aus der Hämolymphe eines Dytiscus. Derselbe wurde ca. 2 Stunden mit direkter Sonne und 4 Stunden mit mittelhellem diffusem Tageslicht belichtet. Es wurden gemischt je

2 ccm E + 2 Tr Gu.

Reihenfolge des Zusatzes wie immer normal.

Nach ca. 15 Min. ergab sich $H > V > D > G$ (*). Derselbe Unterschied blieb auch für die nächsten Stunden bestehen. Nach 3 Tagen ergab sich jedoch die Reihenfolge $V > G > H > D$. Diese Reihenfolge ist indessen das Resultat des allmählichen Ausbleichens dieser wie aller oxydierter Guajaclösungen oder -Suspensionen. (Siehe § 34).

Versuch 74 (P. IV. 80). Verwendet wurde ein anderer, älterer. Körperextrakt eines Hydrophilus. Derselbe wurde 3 Stunden ziemlich kräftiger Sonne ausgesetzt. Es wurden gemischt

je 2 ccm E + 2 Tr Gu.

Sofort V und H viel dunkler als G und D (*).

Nach 15 Minuten sehr deutlich $V > H \geq D \geq G$ (*),

Nach ca. 7 Stunden $V \sim H \geq D \geq G$; dasselbe auch noch nach 12 Stunden (**).

Versuch 75 (P. V. 92). Ein Extrakt aus der Hämolymphe einer ausgewachsenen, überwinternden Cossus-Raupe wurde untersucht. Die Extrakte wurden ca. 6 Stunden von schwacher Sonne belichtet. Darauf wurden gemischt

je 2 ccm E + 2 Tr Gu.

Nach 15 Min. kaum ein Unterschied, alle schwach bräunlichgrün. Nach ca. 14 Stunden $V > H > D \geq G$ (**). Sämtliche Proben wurden darauf ca. 30 Minuten in die Sonne getan. Hierauf sehr deutlich $V > H \geq D \geq G$ (**).

Versuch 76 (P. V. 104). Ein anderer, aber ca. 18 Stunden alter Cossus-Extrakt wurde ca. 8 Stunden belichtet. Er erhielt hierbei 4 Stunden Sonne und ca. 4 Stunden diffuses Licht. Es wurden gemischt

je 2 ccm E + 2 Tr Gu.

Sofort war kaum ein Unterschied festzustellen. Nach ca. 14 Stunden Stehen war nur V dunkler als alle übrigen Proben (*).

Versuch 73 und 74 zeigen wieder den Einfluß des Alters des Extraktes auf die Intensität der „positiven" Lichtwirkung. Außerdem ist zu bemerken, daß die Cossus-Extrakte an und für sich sehr arm an Peroxydasen sind, ein Umstand, auf den später noch eingegangen werden wird.

Versuch 77 (P. V. 106). Derselbe Extrakt wie in Versuch 74 wurde nach weiteren 20 Stunden, nachdem er insgesamt 38 Stunden alt geworden war, ein zweites Mal untersucht, nur wurde er aufs 5fache verdünnt. Die Versuchsgläser standen ca. 30 Stunden und erhielten hierbei zweimal ungefähr 4—5 Stunden schwache Sonne und ca. 8 Stunden diffuses Licht. Es wurden gemischt

je 5 ccm verd. E + 2 Tr Gu.

Nach 20 Minuten sehr schwach: $H > V > G > D$ (*).

Nach 24 Stunden indessen war ein außerordentlich kräftiger Unterschied festzustellen, insofern als H bei weitem am grünsten war; hierauf folgten $V > G > D$ (**).

Daß trotz des hohen Alters des hier verwendeten Extrakts schließlich doch noch ein kräftiger Unterschied zum Vorschein kam, ist zweifellos zum größeren Teile dem Umstand zuzuschreiben, daß hier ein verdünnter Extrakt untersucht wurde.

Endlich sei noch ein Beispiel für einen Versuch mitgeteilt, bei welchem ein Extrakt bei künstlicher und nur diffuser natürlicher Belichtung eine deutlich „positive" Lichtwirkung zeigte.

Versuch 78 (P. N. 44 A). Zur Untersuchung gelangte ein Mehlwurmextrakt. Derselbe wurde zunächst 14 Stunden lang von Auerlicht bestrahlt. Gemischt wurden hierauf je

2 ccm E + 2 Tr Gu + 2 ccm H_2O_2.

Das Resultat (siehe Versuch 48 und 49, § 30) war $G \geq D \geq H > V$ (**).

Hierauf wurde der Extrakt während 32 Stunden zweimal je ca. 8 Stunden von diffusem, schwachem, natürlichem Lichte bestrahlt. Eine Probe ergab hierauf nach 10 Minuten $V > H \geq D > G$ (***). Die Unterschiede sind außerordentlich kräftig.

Aus diesen Versuchen über den Einfluß der Wellenlänge des Lichtes auf die „positiven" Lichtwirkungen ergibt sich, wie vielleicht nach den Versuchen in § 32 zu erwarten war, daß violettes Licht ganz in derselben Weise wie gemischtes, gelbes dagegen ganz wie Dunkelheit wirken. Es zeigt sich sogar, daß in der Mehrazhl der Versuche violettes Licht sogar eine stärkere „positive" Wirkung als gemischtes und gelbes Licht eine noch stärker „negative" Wirkung als Dunkelheit besitzt, ein Verhalten, das auch bei den „negativen" Lichtwirkungen bei schwacher Belichtung gefunden wurde. Auf die interessante Parallele zwischen diesen „positiven" Lichtwirkungen auf tierische Peroxydasen und den „negativen" Einflüssen des Lichtes auf die Katalase wird an späterer Stelle noch eingegangen werden.

§ 35. Eine interessante Erscheinung, welche mir beim Studium der „positiven" Lichtwirkungen auffiel, die ich aber bisher noch nicht so habe studieren können, wie sie es verdient, ist die merkwürdige Tatsache, daß durch schwache Belichtung im Vergleich zu Dunkelextrakten zurückgehaltene Peroxydasenextrakte sich anscheinend erholen, d. h. ihre natürliche Peroxydasenvermehrung wieder beschleunigen können, falls man sie nach kurzer scharfer Belichtung wieder verdunkelt. Ein Versuch der Art ist der folgende.

Versuch 79 (P. N. 53). Ein frischer Extrakt aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer wurde teils verdunkelt, teils diffusem, aber relativ hellem Tageslicht (Dezember) ausgesetzt (mittags 11.30 bis 12.30)

1. Nach 1 Stunde Belichtung wurde eine Probe gemischt

1 ccm E + 2 ccm W + 1 Tr Gu + 1 ccm H_2O_2.

Es ergab sich sofort $H \geq D$, und der Unterschied blieb auch nach 10 Minuten sowie nach 4 Stunden derselbe (*).

2. Die Röhrchen blieben unter denselben Bedingungen noch $3^1/_2$ Stunde stehn. Nur hatte sich inzwischen der Himmel stark bewölkt, so daß bereits nach 3 Stunden (um 3.30 nachmittags) ein Lesen am Fenster kaum mehr möglich war. Es wurde eine gleiche Probe angestellt. Nach 10 Minuten ergab sich $H \sim D$, sehr wenig, nach 20 Minuten dagegen zweifellos, wenn auch nicht sehr stark $D > H$ (**). Nach 2 Stunden war kein Unterschied zwischen beiden Lösungen bemerkbar (***).

3. Die Röhrchen wurden darauf mit Auerlicht 2 weitere Stunden belichtet. Eine unter gleichen Bedingungen hergestellte Probe ergab sofort $H \geq D$, nach 10 Minuten sowie auch späterhin immer $H \geq D$ (*) usw.

Es sei noch bemerkt, daß der Zusatz von Guajac und H_2O_2 hier in der Reihenfolge D, H erfolgte.

Ich möchte bemerken, daß ich noch mehrere Male ähnliche Erfahrungen gemacht habe, auf deren Schilderung ich hier verzichte, da ich nur eine eingehendere Untersuchung dieser interessanten und in ihrer Kompliziertheit stark an biologische Erscheinungen erinnernde Tatsache vorgenommen habe. Bekanntlich können ja auch Organismen, welche z. B. durch andauernde Belichtung negativ phototropisch gemacht worden sind (z. B. Daphnien), durch Verweilen im Dunkeln ihren positiven Phototropismus wiedererlangen. Von besonderem Interesse wäre hier ein näheres Studium der Geschwindigkeiten, mit denen Lichtreaktion und Erholungsreaktion miteinander abwechseln können.

Endlich möchte ich noch kurz die Tatsache erwähnen, daß alle Extrakte, gleichgültig unter welchen Belichtungsbedingungen sie bei Zimmertemperatur gehalten werden, nach längerer Zeit ihren Peroxydasengehalt verlieren. Ein Beispiel hierfür wurde schon früher gegeben (Versuch 63, § 32); andere finden sich bereits in § 26 u. 29. Ganz allgemein sei bemerkt, daß in sämtlichen untersuchten Fällen nach maximal 14 Tagen (in Gegenwart von Choloroform) nur noch sehr schwache Blau- oder Grünfärbungen bei beliebigem H_2O_2- und Guajac-Zusatz erzielt wurden. Dabei wurde auch beobachtet, daß sich diese letzte Zerstörung der Peroxydase schneller im Licht als im Dunkeln vollzog. So ergaben z. B die in Versuch 51 benutzten Extrakte H und D bereits nach 7tägigem Stehen (allerdings bei fast ununterbrochener künstlicher Belichtung) sofort den Unterschied $D \geq H$ (*). Dasselbe wurde in einem nicht beschriebenen Versuch (P. N. 51) beobachtet, in welchem nach 1 Stunde Sonne sehr deutlich der Unterschied $H \leq D$ (**), nach 8 Tagen jedoch ebenfalls $D > H$ (*) beobachtet wurde. Allerdings war in letzterem Falle H blauer gefärbt als D, welches tiefgrün war. Indessen war D sowohl dunkler als auch bei weitem kräftiger als H gefärbt, welch letzteres einen fast durchsichtigen und sehr hellen Farbton besaß.

§ 36. Zusammenfassung. Die wichtigsten Resultate der in § 33 bis 35 beschriebenen Versuche über positive Lichtwirkungen sind folgende:

Direktes Sonnenlicht oder intensives diffuses Tageslicht beschleunigen sofort die natürliche Peroxydasenvermehrung tierischer Extrakte in Gegenwart von Sauerstoff. Bereits nach 5 Minuten Sonnenbelichtung läßt sich zuweilen bei frischen Extrakten (Darminhalt von hungernden Mehlwürmern, überwinternden und hungernden Dytiscus und Hydrophilus, Hämolymphe der letzten beiden sowie ausgewachsener Cossus-Raupen, überwinternde Porthesia-Räupchen) ein deutlicher Unterschied $H \geq D$ nachweisen. Diese Unterschiede treten schneller und intensiver bei frischen als bei alten Extrakten auf. Ferner zeigen verdünntere Extrakte stärkere „positive" Lichtwirkungen als konzentriertere. Morgenlicht scheint besonders intensive „positive" Lichtwirkungen hervorzurufen. Ein einziges Mal gelangten bei einem frischen Extrakt auch nach 6stündiger Belichtung mit Auerlicht „positive" Lichtwirkungen zur Beobachtung.

Was den Einfluß der Wellenlänge anbetrifft, so ergibt sich bei Sonnenlicht oder intensiverem diffusem Licht für die „positiven" Lichtwirkungen sofort die Reihenfolge $V > H \geq D > G$. Meist ist der Unterschied zwischen V und H auf der einen Seite und D und G auf der andern Seite besonders groß, eine Gruppierung, welche oben bereits für die zerstörenden Wirkungen des Lichtes auf die Katalase gefunden wurde. Frische Extrakte zeigen intensivere „positive" Wirkungen als ältere; desgleichen verdünntere eine stärkere Wirkung als konzentriertere. Nähere Einzelheiten sind bei den Versuchen selbst einzusehen.

Es wird auf eine interessante Erscheinung aufmerksam gemacht, welche an „Erholungs"-Erscheinungen insofern erinnert, als ein durch starke Belichtung in seiner Peroxydasenvermehrung beschleunigter Extrakt diese sistiert oder doch sehr verlangsamt, falls die Belichtung plötzlich wieder abgeschwächt wird, verglichen mit einem, unter gleichen Bedingungen gehaltenen verdunkelten Extrakt. Der „positive" Unterschied $H > D$ verwandelt sich m. a. W. bald nach Verringerung oder Entziehung der Belichtung in $H \sim D$, oder $D > H$.

Bei sehr langer Belichtung (über 6 bis 8 Tage) nimmt der

Peroxydasengehalt des belichteten Extraktes wieder ab, und zwar schneller als der eines unter gleichen Bedingungen gehaltenen verdunkelten Extrakts. Allgemein ist zu beobachten, daß tierische peroxydasehaltige Extrakte unter Chloroformzusatz und bei beliebigen Belichtungsbedingungen mit der Zeit ihren Peroxydasengehalt verlieren.

B. Versuche über den Einfluß der Belichtung auf den Peroxydasengehalt lebender Tiere.

§ 37. Um den Einfluß der Belichtung auf den Peroxydasengehalt lebender Tiere untersuchen zu können, bedarf es gewisser experimenteller Vorbedingungen, die im allgemeinen etwas schwierig zu erfüllen sind. Die erste besteht in der Möglichkeit, Extrakte herzustellen, welche in bezug auf ihren Gehalt an „lebender" Substanz gleich konzentriert sind. Für eine derartige Dosierung sind sehr kleine Versuchstiere, welche in toto zu Extrakten verarbeitet werden, können am geeignetsten. Ferner muß es möglich sein, die Versuchstiere möglichst gleichmäßig und vollkommen zu belichten, und endlich muß das Versuchsverfahren möglichst wenig abhängig von den individuellen Verschiedenheiten der einzelnen Individuen sein. Auch hierfür eignet sich kleines, aber in größerer Zahl verwendbares Tiermaterial am besten, und ich habe aus diesen Gründen Versuche über den Einfluß der Belichtung auf den Peroxydasengehalt lebender Tiere vorwiegend an Porthesia-Räupchen angestellt, obgleich für Peroxydasenversuche im allgemeinen gerade diese Organismen wenig geeignet erscheinen. Der Nachteil liegt darin, daß die Extrakte dieser Räupchen ganz im Gegensatz zu ihrem ungemein großen Katalasengehalt nur eine geringe Peroxydasenmenge enthalten, so daß oft nur schwache Grünfärbungen, und diese auch zuweilen erst nach längerem Stehen auftreten (siehe § 33). Immerhin sind sie jedoch als peroxydasehaltig zu bezeichnen, wie die in § 33 geschilderten Versuche beweisen, und wie auch aus Checkversuchen, in welchen statt der Extrakte reines Chloroformwasser verwendet wurde, zur Genüge hervorgeht.

Allerdings bieten die Versuche mit Porthesiaräupchen den für die Theorie der phototropischen Erscheinungen nicht zu unterschätzenden Vorteil, daß sich leicht an demselben Material

gleichzeitig Lichtwirkungen sowohl auf den Katalasen- als auch auf den Peroxydasengehalt untersuchen lassen. In der Tat bin ich denn auch so verfahren, daß ich fast alle drei in § 16—24 auf ihren Katalasengehalt untersuchten Extrakte auch auf die Stärke ihrer Guajacreaktion prüfte. Ich werde dementsprechend in den im folgenden beschriebenen Versuchen stets auf die entsprechenden Katalasenversuche zurückweisen.

Zur Versuchstechnik sei bemerkt, daß ich zur schnelleren und kräftigeren „Differenzierung" etwaiger Unterschiede die zu vergleichenden Extrakte nach Guajac- und H_2O_2-Zusatz ins helle diffuse Tageslicht oder auch direkt in die Sonne, natürlich unter vollkommen gleichen Belichtungs-, Temperatur- usw. Bedingungen brachte. Vielfache Versuche mit anderen Extrakten mit bekannten Unterschieden im Peroxydasengehalt haben mir gezeigt, daß dies Verfahren vollkommen einwandfrei ist, insofern als durch die im Licht schneller verlaufende Eigenoxydation des Guajacs nie ein Unterschied im Peroxydasengehalt verändert, insbesondere etwa umgekehrt wird, abgesehen davon, daß bei zu langer oder starker Belichtung die Unterschiede wegen der überhandnehmenden Eigenoxydation des Guajacs wieder verwischt werden.

Ein orientierender Versuch ergab nun sofort einen deutlichen Unterschied.

Versuch 80 (VI. 1 und 2); siehe hierzu § 16, Versuch 25. Ein Teil der Räupchen war im Dunkeln und Kühlen gehalten worden, ein anderer wurde bei Zimmertemperatur der Sonne ausgesetzt. Näheres siehe § 16, Versuch 25. Nach $2^1/_2$ Tagen Belichtung wurden „Normal"-Extrakte hergestellt und auf ihren Katalasen- und Peroxydasengehalt verglichen. Zur Untersuchung des letzteren wurden gemischt:

I. je 5 ccm E + 3 Tr. Gu;
II. je 5 ccm E + 2 ccm H_2O_2 + 3 Tr. Gu.

I. Nachdem die Mischungen ca. 2 Stunden im Dunkeln gestanden hatten, war kein Unterschied bemerkbar; beide Proben eine Spur grünlich (**). Hierauf wurden beide Proben in die Sonne gestellt. Nach ca. $^1/_2$ Stunde H schwach blauer als D (**). Nach ca. 1 Stunde aber deutlich H > D(**). Nach 24 Stunden Stehen war der Unterschied immer noch deutlich H > D(**). — Gleichzeitig wurde ein Checkversuch mit reinem Chloroformwasser (5 ccm W + 3 Tr. Gu) angestellt. Bei allen Beobachtungen war dies Gemisch stets weniger blau und dunkler gefärbt als H und D(**).

II. Die Mischungen mit H_2O_2 zeigten auch nach 24 Stunden Stehen im Dunkeln keinen zweifelsfreien Unterschied (**). Sie wurden darauf

in die Sonne gestellt. Nach 30 Minuten H schwach blauer als D; nach 1 Stunde H schwach, aber deutlich blauer als D(**). Unterschied nicht so stark wie bei I.

Die entsprechenden Katalasenwerte waren

$$H = .0061; \quad D = .0079.$$

Interessanterweise ergab sich, daß der beobachtete Unterschied im Peroxydasengehalt der Extrakte nach ca. 28stündigem Stehen beider Extrakte in diffusem Tageslicht nicht nur noch erhalten war, sondern sich sogar noch verstärkt hatte.

Versuch 81 (VI. 4). Es wurden wieder gemischt je 5 ccm E + 3 Tr Gu. Nach 5 Minuten in diffusem Licht erscheint bereits H ein wenig blauer als D(**). Beide Röhrchen wurden in die Sonne gestellt. Mach 15 Minuten sehr deutlicher Unterschied $H > D(**)$. H ist grünblauer als D, welch letzteres mehr bräunlich aussieht. Ebenso nach 1 Stunde Sonne $H \geq D(**)$. Auch nach 24 Stunden ist immer noch $H > D(**)$, obschon H im Vergleich zur vorigen Beobachtung sichtlich ausgeblichen erscheint.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Erklärung für diese Verstärkung des Unterschieds bei gleicher Behandlung der Extrakte mit dem Alter darin zu suchen ist, daß bei einem geringeren Anfangsperoxydasengehalt des H-Extraktes die natürliche Peroxydasenvermehrung dieses Extraktes unproportional dem Anfangsgehalt langsamer stattfindet als bei größerem Peroxydasengehalt. Namentlich für autokatalytische Vorgänge scheint es nach der Gestalt der Geschwindigkeitskurven bei verschiedenem Anfangsgehalt des Autokatalysators charakteristisch zu sein, daß (wenigstens in den ersten Stadien der Reaktion) die Geschwindigkeitszunahme nicht proportional der Katalysatorkonzentration ist, sondern schneller als diese zunimmt. An autokatalytische, spez. autoxydative Vorgänge in diesem Zusammenhang zu denken, liegt meiner Ansicht nach eine ganze Reihe von Gründen vor.

Merkwürdigerweise zeigte es sich nun bei einer zweiten Versuchsreihe, bei welcher die Extrakte nicht im diffusen Tageslicht sondern sorgfältig im Dunkeln aufbewahrt wurden, daß im Dunkeln der Unterschied nicht zunahm, sondern im Gegenteil sich verwischte. Allerdings wurde gleichzeitig eine starke Vermehrung des Peroxydasengehalts in beiden Extrakten beobachtet.

Versuch 82 (VI. 7 A und B); siehe hierzu § 17, Versuch 28. Räupchen aus einem Dunkelnest wurden in zwei Partien geteilt, die eine

Partie in verdunkeltem Röhrchen, die andere in hellem Röhrchen 2 Tage lang belichtet. Einzelheiten siehe § 17, Versuch 28. Es wurden gemischt

I. je 2 ccm E + 3 Tr Gu;
II. je 2 ccm E + 1 ccm H_2O_2 + 3 Tr Gu.

I. Sofort (im diffusen Licht) kein Unterschied bemerkbar. Beide Röhrchen in die Sonne getan. Nach 15 Minuten deutlicher Unterschied H > D(**). Nach 2 Stunden Besonnung noch deutlicher H ≥ D(**).

II. Sofort (in diffusem Licht) kein deutlicher Unterschied. Beide Röhrchen in die Sonne getan. Nach 15 Minuten sehr deutlicher Unterschied H ≥ D(**); Unterschied viel kräftiger als bei I. Nach ca. 2 Stunden sehr schöner Unterschied: H intensiv blaugrün, D grünlichbraun.

Die entsprechenden Katalasenwerte waren

H = .0564; D = .0650.

Versuch 83 (VI. 6, A und B). Dieselben in Versuch 82 benutzten Extrakte wurden ca. 14 Stunden sorgfältig im Dunkeln aufbewahrt. Sodann wurden gemischt

I. je 5 ccm E + 3 Tr Gu;
II. je 3 ccm E + 1 ccm H_2O_2 + 3 Tr Gu.

I. Sofort erscheint (im diffusen Licht) H ein wenig grüner als D(**). Beide Röhrchen in die Sonne getan. Nach 15 Minuten Unterschied verschwunden(**); D ein wenig blauer als H(**). Nach ca. 1 Stunde H ≳ D(**); dabei H grüner, D bräunlicher und dunkler(**). Nach ca. 3 Stunden Sonne H > D(**); Unterschied zwar klein, aber unzweifelhaft. Beide Proben sehr stark grün.

II. Sofort erscheint (im diffusen Licht) H ein wenig grüner als D(**). H dabei wieder grüner, D wieder mehr bräunlichgrün. Nach 3 Stunden Sonne H > D; Unterschied schwach, aber unzweifelhaft(**). Beide Proben stark grün, und zwar intensiver als bei I.

Weitere Versuche über den Einfluß gemischten Lichtes auf den Peroxydasengehalt lebender Porthesiaräupchen sind im nächsten Paragraphen wiedergegeben.

Diese Versuche zeigen übereinstimmend, daß in derselben regelmäßigen Weise, in welcher bei Belichtung die Katalase im lebenden Tierkörper zerstört wird, umgekehrt die Peroxydase sich vermehrt. Allerdings beziehen sich diese Versuche zunächst auf intensivere Belichtung, und es soll keineswegs in Abrede gestellt werden, daß bei schwacher Belichtung vielleicht auch eine kleinere Abnahme der Peroxydase (entsprechend der einmal beobachteten geringfügigen Zunahme der Katalase bei diesen Bedingungen) zur Beobachtung gelangen kann. Ich habe hierüber noch nicht eingehendere Versuche anstellen können.

§ 38. Der Einfluß der Wellenlänge des Lichtes auf den Peroxydasengehalt lebender Räupchen wurde wieder parallel mit den entsprechenden Katalasenversuchen untersucht.

Versuch 84. (VI. 12); siehe § 20, Versuch 32. Die Räupchen eines Dunkelnestes wurden in 4 entsprechend vorgerichtete Versuchsgläser verteilt und ca. 10 Stunden schwacher Sonne ausgesetzt. Einzelheiten siehe § 20, Versuch 32. Es wurden gemischt je 2 ccm E + 2 Tr Gu; die Proben wurden sofort nach Guajaczusatz in die Sonne gestellt. Nach ca. 2 Stunden Sonne ergab sich $H \gtrsim V > D > G$(**). Alle Unterschiede sehr ausgesprochen.

Die entsprechenden Katalasenwerte sind:

H = .00518; D = .00755; G = .00817; V = .00543.[1])

Ordnet man die Extrakte gemäß ihrem Gehalt an Peroxydase und Katalase, so erhält man die Reihenfolgen

Peroxydase: $H \gtrsim V > D > G$;

Katalase: $G > D > V \gtrsim H$.

Versuch 85. (VI. 13); siehe § 20, Versuch 33. Von denselben im vorigen Versuch benutzten Räupchen wurden einige weitere 24 Stunden belichtet. Einzelheiten siehe § 20, Versuch 33. Es wurden wieder gemischt je 2 ccm E + 2 Tr Gu. Die Proben wurden ca. 24 Stunden in schwaches diffuses Licht gestellt.

Hierauf ergab sich mit aller wünschenswerten Deutlichkeit $H > V > G \gtrsim D$(**).

Die entsprechenden Katalasenwerte sind:

H = .00341; D = .00528; G = .00569; V = .00475.

Geordnet ergibt sich für beide Fermente:

Peroxydase: $H > V > G \gtrsim D$,

Katalase: $G \gtrsim D > V > H$.

Versuch 86 (VI. 14); siehe § 20, Versuch 34. Nachdem die Räupchen, von denen ein Teil zu Versuch 84 (32) und Versuch 85 (33) benutzt wurden, insgesamt 96 Stunden natürlicher Belichtung (Einzelheiten siehe § 20, Versuch 34) ausgesetzt gewesen waren, wurde eine weitere Peroxydasenprobe vorgenommen. Es wurden wiederum gemischt je 2 ccm E + 2 Tr Gu. Die Proben wurden in schwaches, zuweilen durch Wolken getrübtes Sonnenlicht nach dem Guajaczusatz gebracht.

Bereits nach 1 Stunde zeigen sich prachtvolle Unterschiede:

$H > V \geq D > G$(**).

Die entsprechenden Katalasenwerte sind:

H = .0042; D = .0045; G = .0048; V = .0038.

Geordnet ergeben sich für beide Fermente die Reihenfolgen:

---

[1]) Es ist vielleicht nicht überflüssig, hier zu bemerken, daß die Ausrechnung der Konstanten erst mehrere Monate nach Anstellung sowohl der H_2O_2-Versuche als auch der im Text geschilderten Peroxydasenversuche stattfand.

Peroxydase: $H > V \geq D > G$;
Katalase: $G > D > H > V$.

Versuch 87 (VI. 11); siehe hierzu § 21, Versuch 35. Porthesia-Räupchen wurden 5 Tage lang von natürlichem Licht (meist Sonne) belichtet, so daß sie bereits einzugehen begannen. Es wurden nur lebende Räupchen benutzt. Einzelheiten siehe § 21, Versuch 35. Es wurden gemischt je

2 ccm E + 2 Tr Gu.

Die Proben wurden sofort in die (schwache) Sonne gestellt.

Nach 30 Minuten: $V > H \gtrsim D > G$ (**); Unterschiede indessen sehr schwach. Nach 24 Stunden (mit ca. 4 Stunden Sonne) ist die Reihenfolge: $H \gtrsim V > G > D$ (**).

Die zugehörigen Katalasenwerte sind:

$H = .0067$; $D = .0073$; $G = .0073$; $V = .0061$.

Geordnet ergeben sich die Reihenfolgen:

Peroxydase: $H \gtrsim V > G > D$;
Katalase: $D = G > H > V$.

Versuch 88 (VI. 8 und 9); siehe hierzu § 21, Versuch 36. Es wurden Räupchen untersucht, welche 6 Tage kräftig belichtet worden waren. Die Räupchen in V und G waren sämtlich, die in D zum Teil tot; in H waren alle Räupchen noch lebendig. Es wurden von V und G tote, von D und H lebende Räupchen verwendet. Gemischt wurden

1. je 5 ccm E + 3 Tr Gu;
2. je 3 ccm E + 1 ccm H_2O_2 + 3 Tr Gu.

1. Nach 30 Minuten in diffusem Lichte ergab sich die Reihenfolge: $G \gtrsim D > H \gtrsim V$ (**); die Unterschiede waren indessen recht klein. Nach 4 Stunden diffuser Belichtung ergab sich etwas deutlicher:

$G \gtrsim V > D \gtrsim H$ (**).

2. Nach 30 Minuten in diffusem Lichte ergab sich:

$G > V > H > D$ (**);

die Unterschiede sind viel deutlicher als bei 1. Nach 4 Stunden diffuser Belichtung: $G > V > H > D$ (**).

Die für dieselben Extrakte gemessenen Katalasenwerte sind:

$H = .00687$; $D = .00758$; $G = .00341$; $V = .00408$.

Geordnet ergeben sich die Reihenfolgen:

Peroxydase: 1. (ohne H_2O_2): $G \gtrsim V > D \gtrsim H$;
2. (mit H_2O_2): $G > V > H > D$;
Katalase: $D > H > V > G$.

Diese Versuche zeigen zunächst, daß auch beim Studium des Einflusses der Wellenlänge des Lichtes auf den Peroxydasengehalt im lebenden Tierkörper nur „positive" Lichtwirkungen zu beobachten sind, wobei, nicht zu lange Belichtung voraus-

gesetzt, violettes Licht sehr ähnlich wie gemischtes Licht, gelbes Licht dagegen sehr ähnlich wie Dunkelheit wirkt. Ferner aber ergibt sich mit außerordentlicher, in Anbetracht des biologischen Charakters der Versuche fast erstaunlicher Regelmäßigkeit eine genaue Parallele zwischen der Vermehrung einerseits des Peroxydasengehalts, und der Zerstörung des Katalasengehalts auf der andern Seite bei Belichtung. Vielleicht wird diese Gesetzmäßigkeit durch eine tabellarische Zusammenstellung noch deutlicher vor Augen geführt (Tabelle 34).

Tabelle 34.

Versuch 32 und Versuch 84.	Katalase:	$G > D > V \gtrsim H$;
	Peroxydase:	$G < D < V \lesssim H$.
Versuch 33 und Versuch 85.	Katalase:	$G \geq D > V > H$;
	Peroxydase:	$D \lesssim G < V < H$.
Versuch 34 und Versuch 86.	Katalase:	$G > D > H > V$;
	Peroxydase:	$G < D \leq V < H$.
Versuch 35 und Versuch 87.	Katalase:	$D = G > H > V$;
	Peroxydase:	$D < G < V \lesssim H$.
Vers. 36 u. Vers. 88, I u. II.	Katalase:	$D > H > V > G$;
	Peroxydase:	1. $H \lesssim D < V \lesssim G$;
		2. $D < H < V < G$.

Abgesehen von kleineren Unstimmigkeiten, welche zweifellos auf Versuchsfehlern beruhen, ist die Übereinstimmung der beiden Reihen in allen Versuchen ganz vorzüglich. Insbesondere kommt es bei den Versuchen mit kürzerer Belichtungsdauer, welche die ausgesprochensten Unterschiede zwischen den Wirkungen von Licht verschiedener Wellenlänge ergeben, nie vor, daß die zugeordneten Paare: H und V sowie D und G getrennt werden. Darauf, daß die Beobachtungsreihen für diese zwei oxydativen Fermente vollkommen unabhängig voneinander festgestellt resp. berechnet wurden, ist schon oben hingewiesen worden.

Was die Beziehungen zwischen Lebensdauer und Peroxydasengehalt anbetrifft, so starben die hungernden Räupchen, wie bereits erwähnt, in der Reihenfolge: $G > V > D > H$. Es wurde auch bereits erörtert, daß dieser Reihe der Katalasengehalt der Räupchen kurz vor ihrem Absterben insofern entspricht, als (mit Ausnahme von V) die Räupchen mit dem

größten Katalasengehalt am ehesten sterben. Umgekehrt können wir auf Grund der eben beschriebenen Versuche auch sagen, daß die Räupchen mit dem kleinsten Peroxydasengehalt (unter G oder D) am ehesten sterben, während die mit dem größten Peroxydasengehalt (nach obigen Versuchen immer unter H) auch immer am längsten leben. Dieser letztere Punkt ist besonders wichtig, einmal darum, weil er zeigt, daß der lebenserhaltenden Wirkung des positiven Phototropismus der Porthesia-Räupchen eine Vermehrung der Peroxydase (neben der Zerstörung der Katalase) parallel läuft, sowie zweitens darum, weil in sämtlichen von mir hierüber angestellten Versuchen gerade die maximale Vermehrung der Peroxydase im gemischten Licht absolut regelmäßig ist, und auch niemals z. B. in dem sehr ähnlich wirkenden violetten Licht stattfindet. Das Verhalten des Peroxydasengehaltes im Violetten und auch im Dunkeln bzw. Gelben variiert im Gegensatz hierzu einigermaßen, insofern als namentlich im violetten Licht die Parallele zwischen zunehmender Sterblichkeit und abnehmendem Peroxydasengehalt nicht deutlich vorhanden ist. Für diese Unregelmäßigkeit, welche bei den Peroxydasebestimmungen ersichtlich größer ist als bei den Katalasebestimmungen, ist ohne Zweifel mehr die relativ unbestimmte und ungenaue Bestimmungsmethode des ersteren Ferments als eine Inkongruenz der Tatsachen verantwortlich zu machen.

§ 39. Zusammenfassung. Die wichtigsten Resultate der in § 37 und 38 beschriebenen Versuche über den Einfluß der Belichtung auf den Peroxydasengehalt lebender Porthesia-Räupchen sind folgende:

In derselben regelmäßigen Weise, in welcher bei Belichtung (helles diffuses Tageslicht oder direktes Sonnenlicht) der Katalasengehalt lebender Porthesia-Räupchen zerstört wird, vermehrt sich der Peroxydasengehalt derselben.

Was den Einfluß der Wellenlänge des Lichtes anbetrifft, so begünstigt bei nicht zu langer Exposition violettes Licht in ähnlicher, aber stets etwas schwächerer Weise wie gemischtes Licht die Vermehrung der Peroxydase. Im Gegensatz hierzu wirkt gelbes Licht ähnlich wie Dunkelheit, ja hindert die Peroxydasenentwicklung im lebenden Tierkörper in etwas mehr als der Hälfte der untersuchten Fälle noch stärker als Lichtentziehung.

Es stellt sich ferner eine fast vollkommen genaue Parallele zwischen dem zerstörenden Einfluß der Spektralbezirke auf die Katalase und dem entwickelnden oder vermehrenden Einfluß derselben auf die Peroxydase heraus. Diese Parallele ist auch unter verschiedenartigen Belichtungsbedingungen und insbesondere auch bei variierender Belichtungsdauer immer vorhanden. In einigen Fällen ist die Übereinstimmung absolut, in anderen Fällen variiert nur die Stellung der Belichtungsbedingungen innerhalb der zugeordneten Paare H, V und D, G. Nie findet ein Springen aus einem Paare in das andere statt.

Was die Beziehungen zwischen der Sterblichkeit der hungernden belichteten Räupchen und dem Einfluß des Lichtes auf den Peroxydasengehalt anbetrifft, so ergaben sämtliche Versuche, daß im gemischten Licht, in welchem die Räupchen am längsten leben, stets der höchste Peroxydasengehalt festgestellt werden konnte. Auf der andern Seite entsprach der im Gelb beobachteten größten Sterblichkeit in der Mehrzahl der Fälle auch der kleinste Peroxydasengehalt. Eine Parallele zwischen der Wirkung des violetten Lichts und der Lichtentziehung auf den Peroxydasengehalt und die Sterblichkeit läßt sich auf Grund der bisherigen Versuche mit Deutlichkeit nicht erkennen.

IV. Über die Rolle oxydativer Fermente bei den phototropischen Reaktionen der Tiere.

§ 40. Es erübrigt nun zu untersuchen, welche Beziehungen sich auf Grund der in den vorigen Paragraphen beschriebenen Versuche zwischen dem Gehalt der Organismen an oxydativen Fermenten resp. deren Lichtempfindlichkeit auf der einen Seite, den phototropischen Reaktionen auf der andern Seite ergeben. Ich möchte von vornherein bemerken, daß ich derartige Schlüsse hier nur mit Vorsicht und in möglichster Kürze zu ziehen beabsichtige. Der hauptsächlichste Grund hierfür liegt nicht etwa in einem Zweifel über die Zuverlässigkeit und Konstanz der in dieser Abhandlung geschilderten Versuche, sondern darin, daß vorliegende Arbeit nur einen Teil der experimentellen Untersuchungen enthält, welche ich einerseits bereits angestellt habe, andererseits noch vorzunehmen beabsichtige. Es ist einleuchtend,

daß eine eingehendere Diskussion über den Wert dieser Oxydasenversuche für eine physikalisch- resp. photo-chemische Theorie der phototropischen Erscheinungen zweckmäßiger erst nach Schilderung der in dieser Arbeit noch nicht wiedergegebenen weiteren Versuche über den Zusammenhang zwischen den Eigenschaften der Oxydasen und dem Phototropismus stattfindet. So habe ich z. B. eine ziemlich eingehende Versuchsreihe über den Temperatureinfluß auf die Lichtempfindlichkeit der Katalase, auf die natürliche sowie durch Belichtung beschleunigte Peroxydasenentwicklung in Tieren und Extrakten usw. angestellt; desgleichen wurde auch bereits der Einfluß von H- und OH-Ion, von Kohlensäure, Alkohol und den durch die bekannten neueren Loebschen Untersuchungen so interessant gewordenen Estern (z. B. Äthylacetat) usw. sowohl auf die Lichtempfindlichkeit der Katalase als auch auf die natürliche Entwicklung und Lichtempfindlichkeit der Peroxydase untersucht. Diese Versuche, welche in Hinsicht auf die zitierten Loebschen Versuche über die chemische Beeinflußbarkeit phototropischer Reaktionen von besonderer Wichtigkeit sind, werden, nachdem ich sie zum Teil noch ergänzt und wiederholt habe, in einer nächsten Abhandlung wiedergegeben werden. Endlich sind auch noch Untersuchungen über den wichtigen Einfluß des Nervensystems und des optischen Sinnesapparates auf den Gehalt lebender Tiere an oxydativen Fermenten im Gange.

Ich glaube indessen, daß schon auf Grund des hier wiedergegebenen Versuchsmaterials folgende Beziehungen zwischen Oxydasengehalt und Phototropismus mit einiger Sicherheit aufgestellt werden können: 1. Zunächst entspricht dem „positiven" oder „negativen" Sinn des Phototropismus der hier untersuchten Insekten ein deutlicher Unterschied im Verhältnis der Mengen, in welchen sich die zwei hier untersuchten Fermente in den aus diesen Tieren hergestellten Extrakten nachweisen lassen. Diese Beziehung wird am deutlichsten, wenn wir die extremsten hier untersuchten Vertreter positiv und negativ phototropischer Tiere: die intensiv negativ phototropischen Mehlwürmer einerseits, die intensiv positiv phototropischen Porthesiaräupchen andererseits miteinander vergleichen. Die Verbreitung der Peroxydase ist nun für diese Tiere besonders charakteristisch insofern, als die Mehlwurm-

extrakte mir die intensivsten Guajacreaktionen ergaben, welche ich überhaupt beobachtet habe, während auf der andern Seite die Porthesiaräupchen immer nur relativ schwache, ja bei frischen Extrakten regelmäßig überhaupt keine zweifelsfreie Peroxydasenreaktion gaben. Vielleicht sind in diesem Punkt die intensiv positiv phototropischen geflügelten Ameisen (Camponotus) noch charakteristischer insofern, als ich bei den aus ihnen hergestellten Extrakten überhaupt keine Guajacreaktion feststellen konnte. Was die Verbreitung der Katalase auf der andern Seite anbetrifft, so sind zwar die Unterschiede nicht so deutlich wie in der Verbreitung der Peroxydase, da sich in allen Extrakten, auch in Extrakten aus dem Darminhalt hungernder Mehlwürmer Katalase nachweisen läßt, wohl aber fällt der ganz ungemein hohe Katalasengehalt der positiv heliotropischen Porthesiaräupchen, fernerhin auch der geflügelten Ameisen auf, der bei den Räupchen ein Arbeiten mit Extrakten von 1 Räupchen auf 1 ccm Chloroformwasser (= ca. 0.2 Gewichtsprozent) gewöhnlich in einer Verdünnung von 1 Teil Extrakt auf 10 Teile H_2O_2 (= ca. 0.02 Gewichtsprozent) gestattete, wobei sich bei ca. $\frac{H_2O_2}{50}$ Geschwindigkeitskonstanten von der Größenordnung: $.4343\,K = .01$ ergaben. Eine vergleichende Untersuchung des Katalasengehaltes verschiedener Tierspecies wäre nur sehr schwierig auszuführen, da jedenfalls auch die Katalase wie andere Fermente eine spezifische Verteilung in den Organen eines Tieres hat. Indessen haben meine Versuche jedenfalls mit beträchtlicher Wahrscheinlichkeit ergeben, daß in den Porthesia- und Camponotusextrakten die Menge fremder Substanzen, welche z. B. bei H_2O_2-Zersetzung die Schärfe des Titrierens hindern resp. selbst einen $KMnO_4$-Titer ergeben, von allen untersuchten Extrakten am kleinsten ist. — Die ferner untersuchten Insekten Hydrophilus, Dytiscus und Cossusraupen zeigen nun deutlich, sowohl was den Sinn ihrer phototropischen Reaktionen als auch die relative Verteilung ihres Katalasen- und Peroxydasengehalts anbetrifft, eine mittlere Stellung. Es wurde oben schon berichtet, daß insbesondere diese Käfer in sehr variierender Weise indifferent bis positiv oder negativ phototropisch sind, zum wenigsten zu der Zeit und den Umständen, unter welchen sie hier zur Untersuchung

gelangten. Dem entspricht nun vollkommen die Verteilung der beiden Oxydasen insofern, als hier sowohl sehr kräftige Guajacreaktionen als auch sehr intensive H_2O_2-Zersetzungen beobachtet wurden.

Es scheint aus diesen Feststellungen hervorzugehen, daß es charakteristisch für negativ phototropische Tiere ist, einen hohen Peroxydasengehalt, aber einen im Verhältnis hierzu kleinen Katalasengehalt zu besitzen. Umgekehrt wurde gefunden, daß ausgesprochen positiv heliotropische Tiere nur sehr geringe Mengen oder gar keine Peroxydase in ihren Extrakten nachweisen lassen, während diese letzteren ihrerseits wieder ungemein reich an Katalase sind. Wenn schon ich nicht verkenne, daß zur endgültigen Festlegung dieser Gesetzmäßigkeit weitere Untersuchungen an anderen Tierspecies sehr wünschenswert sind, so möchte ich doch betonen, daß die hier untersuchten sechs Species zu Anfang der Untersuchung nur deswegen gewählt wurden, weil sie in der Tat als besonders typische Vertreter der verschiedenen Klassen phototropischer Tiere erschienen resp. bekannt sind. Dies gilt insbesondere für die extremen Vertreter des positiven und negativen Phototropismus. — Vielleicht ist die Bemerkung nicht überflüssig daß ich zu Beginn der Untersuchung keineswegs ein derartiges Verhalten erwartet hatte.

Auf Grund dieses Ergebnisses sollte man folgern, daß z. B. periodisch phototropische Tiere, wie z. B. geflügelte Ameisen, Blattläuse, indessen auch Dytiscus und Hydrophilus zur Zeit der höchsten Geschlechtsreife (Schwärmzeit) auch in bezug auf das Verhältnis der beiden oxydativen Fermente periodisch variieren, indem z. B. zur Zeit der Geschlechtsreife mit dem parallelen Entstehen eines intensiven positiven Phototropismus auch eine intensive Vermehrung der Katalase stattfinden sollte. In entsprechender Weise sollte bei manchen Insektenlarven, welche kurz vor Beendigung ihres Larvenstadiums ausgesprochen negativ phototropisch werden, eine entsprechende Steigerung des Peroxydasengehalts beobachtet werden. Ich bin bisher noch nicht in der Lage gewesen, diese Folgerung zu prüfen. Daß aber die physiologischen Oxydationsvorgänge gerade in den bezeichneten biologischen Perioden, zumal zur Zeit der Geschlechtsreife, abnorme Werte erlangen, ist bekannt.

§ 41. Weiterhin hat sich bei den Versuchen mit Porthesiaräupchen sowie nach Experimenten mit Mehlwürmern, welche hier nicht mitgeteilt wurden, ergeben, daß die positiv phototropische Reaktion der Porthesiaräupchen sowie die negativ phototropische Reaktion der Mehlwürmer ein lebenserhaltender Akt ist insofern, als die positiv phototropischen hungernden Räupchen länger im Hellen als im Dunkeln, die hungernden Mehlwürmer länger im Dunkeln als im Hellen bei sonst vollkommen gleichen Versuchsbedingungen am Leben bleiben. Ich glaube, daß diese finale Seite der phototropischen Vorgänge noch keineswegs die Beachtung gefunden hat, welche sie verdient, und ich selbst wurde erst im Verlauf der Versuche auf ihre Wichtigkeit aufmerksam. Diese Frage ist darum für eine photochemische Theorie des Phototropismus so wichtig, weil die Tatsache der größeren Sterblichkeit unter den dem Sinn des vorhandenen Phototropismus entgegengesetzten Belichtungsbedingungen mit aller Deutlichkeit auf die Zwangsläufigkeit der phototropischen Reaktionen hinweist. Die anthropomorphen Vorstellungen über die freie „modifiability of behaviour" usw. derartiger Organismen, wie sie z. B. neuerdings von einigen amerikanischen Biologen wieder aufgebracht worden sind, berücksichtigen alle nicht diesen Umstand, daß ein Tier darum positiv phototropisch ist, weil es unter sonst gleichen Versuchsbedingungen im Hellen länger am Leben bleibt. Natürlich gilt diese Erhaltungsmäßigkeit der phototropischen Reaktionen nur so lange, solange sekundäre Einflüsse die vom Licht abhängigen Vorgänge im Tierkörper nicht überdecken. Es ist aber möglich, diese sekundären Einflüsse durch entsprechende Versuchsbedingungen weit herabzudrücken oder konstant zu halten, so daß die Wirkungen des Lichtes die Hauptrolle spielen. Dies geht z. B. aus den Versuchen mit hungernden Tieren deutlich hervor. (Vergleiche übrigens hierzu die schönen Ausführungen von J. Loeb, Journ. of exper. Biology, 4, 1907: „Concerning the Theory of Tropisms").

Auch insofern kann für den Begriff der „modifiability of behaviour" ein besserer, weil experimentell greifbarer Begriff gesetzt werden, als man auf Grund obiger Versuche für die Tatsache, daß manche Tiere positiv, manche negativ, manche wiederum periodisch phototropisch sind, das in ganz bestimm-

tem Sinne variierende Verbreitungsverhältnis der hier untersuchten Oxydasen setzen kann. Ich hüte mich, zu behaupten, daß mit dem geschilderten Verhalten dieser beiden Fermente die genannten Formen phototropischer Tiere erschöpfend charakterisiert sind. Im Gegenteil habe ich eine Anzahl hier nicht geschilderter Versuche angestellt, welche z. B. auch für die Tyrosinase der Insekten eine wechselnde Verbreitung, die, beiläufig gesagt, im großen und ganzen parallel mit der Verbreitung der Peroxydase geht, ergaben. Selbstverständlich werden sich bei weiterem Studium noch mehr lichtempfindliche Stoffe, Prozesse und Verhältnisse ergeben, welche ebenfalls für positive und negative phototropische Tiere charakteristisch sind.

§ 42. Versucht man nun näher zu analysieren, worin die lebenserhaltende Wirkung der Belichtung bei einem positiv phototropischen Tiere besteht, so geben die oben beschriebenen Versuche hierauf die folgende Antwort. Durch intensivere Belichtung der Extrakte, insbesondere aber auch der lebenden Tiere, findet durchweg, soweit die obigen Untersuchungen sich erstrecken, gleichzeitig eine Verminderung des Katalasengehalts und eine Vermehrung des Peroxydasengehalts statt. Es ist charakteristisch, daß diese entgegengesetzte Wirkung deutlicher bei Belichtung lebender Tiere als bei Belichtung von Extrakten zum Vorschein kommt, wenn schon auch bei den letzteren bei größeren Lichtintensitäten oder bei längerer Belichtungsdauer der bezeichnete Parallelismus außer Zweifel steht. Es folgt also hieraus, daß in einem positiv phototropischen Tiere die genannten zwei Fermente in einem physiologischen Ungleichgewicht stehen, wie namentlich daraus hervorgeht, daß positiv phototropische Tiere (Porthesiaräupchen) im Dunkeln eher sterben als im Hellen. Dieses Ungleichgewicht wird durch die positiv phototropische Reaktionsfähigkeit im Sinne einer Annäherung an ein physiologisches Gleichgewicht dadurch verschoben, daß die im positiv phototropischen Tier überwiegende Katalase vermindert, die kaum oder nur in geringer Menge vorhandene Peroxydase durch Belichtung vermehrt wird. Auf der andern Seite wird bei einem negativ phototropischen Tier durch die negative Reaktion, d. h. durch Lichtentziehung einer weiteren photochemischen Vermehrung der von vornherein in relativ großer

Konzentration vorhandenen Peroxydase vorgebeugt sowie andererseits die Entwicklung oder zum wenigsten die Erhaltung der Katalase begünstigt. Wir können also positiv phototropische Tiere als in einem positiven Ungleichgewicht in bezug auf die Katalase, negativ phototropische Tiere als in einem positiven Ungleichgewicht in bezug auf die Peroxydase bezeichnen und die entsprechenden Richtungsbewegungen als Reaktionen auffassen, welche diese zwei extremen Verhältnisse im Sinne einer Annäherung an einen mittleren oder normalen Wert verschieben.

Was nun eine eingehendere Begründung dieser Anschauungen resp. eine entsprechende Parallelisierung der Einzelheiten anbetrifft, so sei hier in Kürze nur der folgende Punkt hervorgehoben. Besonders deutlich ist die Parallele zwischen dem Einfluß der Wellenlänge des Lichtes einerseits auf den Oxydasengehalt tierischer Extrakte, andererseits auf die phototropischen Erscheinungen. Hier wie dort wirkt violettes Licht wie gemischtes Licht, gelbes (oder rotes) Licht wie Dunkelheit, und zwar ergab sich einwandsfrei bei den Versuchen über den Lichteinfluß auf den Oxydasengehalt lebender Tiere sogar mit erstaunlicher Genauigkeit, daß der Einfluß der Wellenlänge auf Peroxydase und Katalase ein entgegengesetzter ist, ein Verhalten, welches die oben dargelegten Anschauungen fordern. Weitere Parallelen ergeben sich leicht bei einem Vergleich der in der folgenden Zusammenfassung zusammengestellten wichtigsten Versuche mit den entsprechenden phototropischen Erscheinungen. Eine ausführlichere Diskussion dieser Einzelheiten möchte ich erst dann vornehmen, wenn meine Versuche über den Einfluß von H- und OH-Ion, Alkohol usw. beendet und publiziert sein werden.

§ 43. Zu Anfang dieser Arbeit wurde mitgeteilt, daß der Gedanke, die phototropen Reaktionen der Tiere könnten Atmungsreaktionen im allgemeinen Sinne des Wortes sein, den Anlaß zu den vorliegenden Untersuchungen gab. Von den zwei Wegen, welche für eine Prüfung dieses Gedankens mir zunächst in Betracht zu kommen schienen, habe ich aus oben näher angegebenen Gründen die Veränderlichkeit oxydativer Fermente unter dem Einfluß des Lichtes der Untersuchung des Wechsels z. B. des respiratorischen Koeffizienten unter

wechselnden Belichtungsbedingungen vorgezogen. Daß übrigens auch auf diesem Wege positive Resultate für eine derartige Theorie des tierischen Phototropismus zu erlangen gewesen wären, zeigen u. a. die Untersuchungen von Luciani und Lo Monaco[1]), welche fanden, daß die energisch positiv phototropischen jungen Räupchen des Seidenspinners bei Tage, d. h. im Lichte, bedeutend mehr Kohlensäure abschieden als in der Nacht (im Dunkeln). Es fragt sich nun, ob und in welcher Weise die hier mitgeteilten Oxydasenversuche für die Berechtigung der Annahme sprechen, daß die lichtempfindlichen Prozesse, welche den phototropischen Reaktionen zugrunde liegen, die Vorgänge der allgemeinen Gewebeatmung sind.

Diese Frage ist eng verknüpft mit dem Problem des Mechanismus der physiologischen Verbrennung überhaupt. Es wurde schon oben des öfteren Gelegenheit genommen, darauf hinzuweisen, daß wir leider über diesen Mechanismus noch sehr im unklaren sind und daß das einzige, was wir nach den neueren Forschungen mit beträchtlicher Wahrscheinlichkeit, vielleicht mit Sicherheit sagen können, das ist, daß die physiologische Verbrennung nur ein fermentativer oder katalytischer Vorgang sein kann. Auch die vor der Kenntnis des Vorhandenseins und der Rolle oxydativer Fermente vor fast 20 Jahren ausgesprochene Ansicht von Pfeffer, daß es zur physiologischen Oxydation vieler Stoffe eines „Mitreißens in das Stoffwechselgetriebe" bedarf, ist nur ein anderer Ausdruck für diesen auf neueren Forschungen beruhenden Schluß, da die Pfeffersche Kennzeichnung sich ja gerade auf die Einführung von Reaktionen bezieht, deren charakteristische Eigenschaft der Umstand ist, daß sie sich unter gewöhnlichen Umständen nur äußerst langsam vollziehen.

Wenn es nun auch wegen des Fehlens einer einwandfreien und überzeugenden fermentativen Theorie der physiologischen Verbrennung nicht möglich ist, die Einzelheiten des Einflusses der Belichtung auf denselben mit wünschenswerter Schärfe nachzuweisen, so folgt doch aus der in obigen Versuchen beschriebenen zweifellos starken Lichtempfindlichkeit oxydativer

---

[1]) Luciani und Lo Monaco: Arch. ital. de Biol. 23, 424 bis 433, 1895; Atti della R. accad. dei Georgofili 18, 1895.

Fermente, daß auch die durch diese Fermente veranlaßten oder beschleunigten Reaktionen, also die allgemeinen Atmungsvorgänge selbst, lichtempfindlich sind. Denn obschon die diesbezüglichen Versuche in einer nächsten Abhandlung geschildert werden, hat es sich, wie überdies zum Teil bekannt, resp. zu erwarten war, auch bei den hier untersuchten tierischen Oxydasen gezeigt, daß die Geschwindigkeiten der Reaktionen abhängig von den Konzentrationen der Fermente sind. Auf der anderen Seite aber kann nicht angenommen werden, daß die zwei untersuchten Fermente trotz ihrer, in charakteristischer und konstanter Weise variierender Verbreitung überhaupt keine Rolle bei diesen Prozessen spielen. Denn obschon aus dem Vorhandensein derartiger Stoffe nicht ohne weiteres die Notwendigkeit ihrer Verwendung im tierischen Stoffwechsel folgt, so sind doch mehrere Punkte bereits in der Einleitung angeführt worden, welche gerade die Mitwirkung dieser zwei Fermente wahrscheinlich machen. Wollte man die Mitwirkung gerade dieser zwei oxydativen Fermente bestreiten, so wäre man genötigt, nach anderen Oxydasen, von welchen bisher nichts bekannt ist, zu suchen. Im übrigen ist ja z. B. die Mitwirkung der Katalase bei der Reduktion des Oxyhämoglobins, wie oben erwähnt wurde, sehr wahrscheinlich gemacht worden, und, was das Vorkommen von Peroxydasen in lebenden Organismen anbetrifft, so möchte ich den von mir angestellten Versuch, nachdem ein Tropfen Hämolymphe von Dytiscus usw. sofort nach der Entleerung aus der Leibeshöhle (d. h. innerhalb der ersten Minute) mit H_2O_2 und Guajac eine Bläuung gibt, anführen.

Endlich spricht auch die spezifische Lichtempfindlichkeit beider Fermente im Zusammenhang mit den phototropischen Erscheinungen lebhaft für die Mitwirkung beider Fermente sowie für eine Reaktions-Kuppelung der durch sie beschleunigten Reaktionen, und gestattet umgekehrt wieder einen positiven Schluß für die Annahme, daß die phototrophischen Reaktionen in der Tat Atmungsreaktionen sind. Der hier in Frage kommende Punkt ist der bemerkenswerte Umstand, daß sowohl die positiven wie die negativen phototropischen Reaktionen zur Annäherung eines Verhältnisses dieser beiden Fermente, welches bei positiven und negativen Tieren gleich

extrem, aber von entgegengesetztem Wert ist, an einen Mittelwert, d. h. zu einer Ähnlichkeit der durch diese Fermente bedingten Reaktionen und Reaktionsfolgen führen. Es liegt nun sehr nahe, anzunehmen, daß dieses mittlere Konzentrationsverhältnis, welches von positiv und negativ phototropischen Tieren in gleichem Sinne, aber auf entgegengesetzten Wegen erstrebt wird, dasjenige ist, bei welchem die integrierenden Vorgänge der Gewebeatmung normal, d. h. möglichst erhaltungsgemäß verlaufen. Wie bereits oben erwähnt, hat schon Pfeffer die Möglichkeit eines derartigen normalen Verhältnisses zwischen den hier in Betracht kommenden Oxydations- und Reduktionsvorgängen ins Auge gefaßt. Diese Annahme wird nun auf das kräftigste unterstützt durch die Tatsache, daß die phototropischen Reaktionen bei Ausschaltung sekundärer Einflüsse wirklich erhaltungsgemäße sind, wie dies oben ausführlich erörtert wurde. — Ich glaube, daß in der Tat von dieser Seite her der Annahme, daß phototropische Reaktionen Atmungsreaktionen sind, nicht nur keine Schwierigkeiten entgegenstehen, sondern nur Unterstützungen für sie zu erwarten sind.

§ 44. Endlich möchte ich noch kurz auf einen Punkt eingehen, der anscheinend von besonderer Komplikation, allerdings aber auch von besonderem Interesse ist. Dies ist der Einfluß des Nervensystems sowie der optischen Sinnesorgane auf die phototropischen Reaktionen der Tiere. Bekanntlich ist eine phototropische Reaktionsfähigkeit nicht notwendig verknüpft mit dem Vorhandensein von Licht perzipierenden Organen.[1]) Wohl aber ist es auf der andern Seite unzweifelhaft, daß in vielen Fällen diese Organe mitwirken, resp. eine Steigerung der Lichtempfindlichkeit im Vergleich zu der solcher Tiere, denen die Augen entfernt worden sind, veranlassen. Bei Tieren, welche, wie z. B. Dytiscus und Hydrophilus, vollkommen von einem dicken Chitinpanzer umgeben sind, erscheint eine Beeinflussung auf einem andern nicht nervösen Wege und gleichzeitig damit das Zustandekommen einer phototropischen Reaktion überhaupt nicht gut möglich. Man kann nun fragen, in welchem Zusammenhang diese Erscheinungen mit den hier ver-

[1]) J. Loeb: Vorles. über d. Dynamik d. Lebensersch. 1906, 188

tretenen Anschauungen über die Rolle photochemisch beeinflußbarer Oxydationsvorgänge bei den Erscheinungen des Phototropismus stehen.

Zunächst ist bekannt, daß nicht nur bei höheren Tieren die Atmungsbewegungen von nervösen Zentren abhängig sind, sondern es ist z. B. von Vernon[1]) gezeigt worden, daß auch die Gewebeatmung bei Fröschen und Kröten, namentlich in ihrer Abhängigkeit von der Temperatur und gemessen durch die Kohlensäureabgabe, von nervösen Zentren im Rückenmark weitgehend beeinflußt wird. Sodann möchte ich an die bekannten Pawlowschen Versuche über die nervöse Beeinflussung der Magensaft- ev. auch der Pankreassaft-Sekretion erinnern, welche bei aller Kritik in bezug auf den Anteil, welchen die nervöse Produktion im Vergleich zur chemischen Reizung an dem Gesamtergebnis hat, doch unzweifelhaft die Möglichkeit einer Steigerung der Sekretion ganz spezifischer Fermente auf nervösem Wege erwiesen haben. Ich möchte nun die Vermutung aussprechen, daß auch durch die lichtperzipierenden Nerven, resp. ihre Sinnesorgane eine Beeinflussung und insbesondere eine Steigerung in der Bildung von Fermenten möglich ist, sowie daß es am nächstliegendsten erscheint, anzunehmen, daß gerade die lichtempfindlichen Oxydasen durch Nerven, welche auf Lichtreize reagieren, vermehrt oder vermindert werden können. Vielleicht ist es in diesem Zusammenhange zweckdienlich, darauf hinzuweisen, daß bekanntlich der Sehpurpur der höheren Tiere nach Belichtung eine deutlich saure Reaktion zeigt, ein Umstand, welcher durchaus auf stattgehabte Oxydationsvorgänge schließen läßt. Gut entsprechen würde der namentlich bei niederen Tieren zu beobachtenden relativen Unabhängigkeit der Lichtempfindungen und phototropischen Reaktionen von bestimmten Nerven oder Nervenendigungen die große Verbreitung und im Vergleich zu anderen Fermenten relativ geringe Lokalisierung der beideu oxydativen Fermente. In der Tat findet die nach den bisherigen Ergebnissen als durchaus allgemein zu bezeichnende Verbreitung der genannten zwei Oxydasen eine ausgezeichnete Parallele in der gleichfalls überall zu beobachtenden Reaktionsfähigkeit tierischer Organismen auf Belichtung.

[1]) Vernon: Journ. of Physiol. 21, 443—496, 1897.

Man könnte eine derartige nervöse Beeinflussung des Oxydasengehalts lebender Tiere derart nachzuweisen versuchen, daß man z. B. zwei Dytiscus, bei welchen eine „dermatoptische" Lichtempfindlichkeit ausgeschlossen ist oder vielleicht ausgeschlossen werden könnte, verschiedenen Belichtungsbedingungen aussetzt, indem man das eine Exemplar belichtet, das andere verdunkelt, oder dem einen Exemplar die Augen exstirpiert oder mit Lack bedeckt und beide belichtet. Ich habe derartige Versuche begonnen.

V. Zusammenfassung.

In folgender Zusammenfassung sollen nur die wichtigsten neuen Resultate der vorliegenden Untersuchung in möglichster Kürze wiedergegeben werden. Auf die bei diesen Versuchen benutzten Methoden sowie auf alle Einzelheiten muß auf den Text verwiesen werden.

1. Der Zweck der vorliegenden Abhandlung bestand darin, nach eventuellen photochemischen Unterlagen für die phototropischen Reaktionen der Tiere zu suchen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob der auf Grund allgemein biologischer Erwägungen sich ergebende Gedanke, daß die phototropischen Reaktionen der Tiere in engem Zusammenhang mit den Vorgängen der allgemeinen Gewebeatmung stehen, experimentell gestützt werden kann. Von den verschiedenen Methoden, die in Betracht kamen, wurde die Untersuchung der Lichtempfindlichkeit der oxydativen Fermente, welche bei der Gewebeatmung zweifellos eine sehr wichtige, wenn auch noch nicht vollständig aufgeklärte Rolle spielen, gewählt. Diese untersuchten 2 Fermente sind die H_2O_2 zersetzende Katalase und die Guajac mit und ohne H_2O_2 bläuende Peroxydase. Alle Einzelheiten der Versuchstechnik usw. siehe den Text.

2. Katalasenextrakte, sowohl aus frisch mit Chloroform getöteten als auch aus getrockneten Tieren hergestellt, werden kräftig und schnell durch künstliche und natürliche Belichtung zerstört. Desgleichen wird auch die H_2O_2-Zersetzung selbst durch Licht bedeutend verlangsamt. Die zerstörende Wirkung

des Lichtes nimmt hierbei zu bei abnehmender H_2O_2-Konzentration usw. Was den Einfluß der Wellenlänge des Lichtes anbetrifft, so nimmt die zerstörende Wirkung des Lichtes ab in der Reihenfolge Hell > Violett > Gelb > Dunkel. — Die Versuche wurden angestellt mit Extrakten aus lebenden Dytiscus, Hydrophilus, Porthesia-Räupchen und mit Extrakten aus getrockneten Porthesia-Räupchen.

3. Gleich den Fermentlösungen und Reaktionsgemischen erleiden auch die lebenden Räupchen von Porthesia chrysorrhoea bei Belichtung einen beträchtlichen Verlust an Katalase. Dies wurde durch Untersuchung von „Normal"-Extrakten von Räupchen, die im Dunkeln, und solchen, die im natürlichen Licht gehalten wurden, festgestellt. Dieser Unterschied ist auch bei Berücksichtigung der Temperatur sowie bei Benutzung des Materials aus einem Neste stets vorhanden.

4. Im Dunkeln findet sowohl bei einer Temperatur von 8 bis 10^0 als auch von 15 bis 19^0 anfänglich eine Vermehrung der Katalase statt, welche aber bei längerer Versuchsdauer regelmäßig in eine Abnahme der Katalase übergeht. Dieser An- und Abstieg findet viel schneller bei der genannten höheren als bei der tieferen Temperatur statt. Die anfängliche Vermehrung ist jedenfalls auf eine Steigerung der physiologischen Funktionen infolge der im Vergleich zur Überwinterungstemperatur des Nestes (nicht über 6^0) in beiden Fällen höheren Versuchstemperatur zurückzuführen.

5. Der Einfluß der Wellenlänge des Lichtes auf den Katalasengehalt lebender Räupchen ist ein ziemlich verwickelter.

6. Während der ersten ca. 3 Versuchstage nimmt der Katalasengehalt in folgender Reihenfolge ab: Gelb > Dunkel > Violett > Hell. Es zeigt sich insofern ein wichtiger Unterschied im Vergleich zu dem entsprechenden Verhalten von Fermentextrakten und Reaktionsgemischen, als im gelben Lichte der größte Katalasengehalt gefunden wurde. Der Grund hierfür liegt darin, daß zunächst die anfängliche Steigerung des Katalasengehaltes, wie sie im Dunkeln bereits festgestellt wurde, auch im gelben Lichte, aber hier in einem noch größeren Umfang stattfindet. Sodann wird auch die Konservierung der Katalase resp. vielleicht die physiologische, der Lichtzerstörung entgegenwirkende Neubildung der Katalase

durch die gelben Strahlen begünstigt. Im Gegensatz hierzu läßt sich im violetten Lichte keine anfängliche Vermehrung beobachten; der Gehalt nimmt mit der Belichtung stetig ab. Es scheint also die physiologische Bildung der Katalase ein Prozeß zu sein, welcher im Vergleich zur Dunkelreaktion durch gelbe Strahlen begünstigt, durch violette dagegen gehemmt wird, in ähnlicher Weise, wie dies von Trautz und Thomas für gewöhnliche chemische Reaktionen gefunden worden ist. — Eine vorübergehende Vermehrung der Katalase auch im gemischten, aber schwachen diffusen Licht, welche voraussichtlich auf die Wirkung der im gemischten Licht vorhandenen gelben Strahlen zurückzuführen ist, wurde einmal beobachtet.

7. Bei längerer Versuchsdauer (über 3 Tage) sterben die Räupchen bei gleichen Temperatur usw. — Bedingungen in folgender Reihenfolge: Gelb, Violett, Dunkel, Hell. Es zeigt sich also, daß die normale positiv phototropische Reaktion der Räupchen in der Tat eine lebenserhaltende ist, ein Umstand, der für die physiologische Theorie des Phototropismus von Wichtigkeit ist. Beim Vergleich der Sterblichkeit mit dem Katalasengehalt von zwar noch lebenden, aber kurz vor dem Absterben befindlichen Räupchen ergiebt sich, mit Ausnahme zunächst von „Violett", daß die Räupchen mit dem höchsten Katalasengehalt am ehesten sterben. Der Katalasengehalt nimmt in diesen Versuchsstadien ab in der Reihenfolge: Gelb > Dunkel > Hell; die gleiche Reihe zeigt die Sterblichkeit. Im violetten Licht nimmt der Katalasengehalt während der letzten Lebenszeit der Räupchen außerordentlich stark ab und sinkt unter sämtliche anderen Werte. Trotzdem sterben die Räupchen nicht am spätesten, sondern nach den im gelben Licht gehaltenen. Der Grund hierfür liegt, wie des näheren auseinandergesetzt wird, mit großer Wahrscheinlichkeit darin, daß ebenso wie zu intensive Beleuchtung eine Umkehrung der positiven phototropen Reaktion vieler Tiere in eine negative Reaktion veranlaßt, auch eine übermäßige Zerstörung der Katalase schädlich wirkt. Diese übermäßige Zerstörung der Katalase im violetten Lichte wird darauf zurückgeführt, daß das violette Licht, wie schon aus dem Fehlen der sonst allgemein gefundenen anfäng-

lichen Steigerung des Katalasengehaltes hervorgeht, jede Neubildung oder Regeneration der zerstörten Katalase hindert.

8. Weiterhin wurde eine Variation der Färbung der Extrakte, die aus unter verschiedenen Belichtungsbedingungen gehaltenen Räupchen hergestellt wurden, beobachtet. Die Extrakte aus „Dunkel"-Raupen waren weniger gelblich als die der „Hell"-Raupen gefärbt. Ein Vergleich zwischen dem Einfluß der Wellenlänge des Lichtes auf den Katalasengehalt und die Färbung der Extrakte ergab, daß die Extrakte um so gelblicher sind, je weniger Katalase sie enthalten.

9. Endlich wurde gefunden, daß die Räupchen im Hellen im Vergleich zu den „Dunkel"-Räupchen regelmäßig an Gewicht zunehmen. Ein Zusammenhang zwischen dieser Gewichtsveränderung und dem Katalasengehalt ließ sich nicht feststellen; die Gewichte der Räupchen nahmen in einem Versuch über den Einfluß farbigen Lichtes ab in der Reihenfolge: Hell > Dunkel > Gelb > Violett, der Katalasengehalt in der Reihe: Dunkel > Hell > Violett > Gelb.

Die Untersuchungen über den Einfluß der Belichtung auf den Peroxydasengehalt tierischer Extrakte ergaben insbesondere die folgenden Resultate.

10. Bei geringen Belichtungsintensitäten (schwaches diffuses natürliches Licht und Auerlicht) übt das Licht Wirkungen aus, welche die natürliche Vermehrung peroxydasehaltiger Extrakte in Gegenwart von Sauerstoff hindern. Diese „negativen" Lichtwirkungen sind stärker bei alten und konzentrierten Extrakten als bei frischen und verdünnteren, resp. dauern länger bei ersteren als bei letzteren. (Bei längerer Versuchsdauer findet eine Umkehrung der „negativen" zu „positiven" Lichtwirkungen statt (siehe den nächsten Absatz). Frische Extrakte zeigen diese Umkehr nach kürzerer Belichtung als alte). Wie aus speziellen Versuchen hervorgeht, handelt es sich bei diesen „negativen" Lichtwirkungen nicht um eine Zerstörung der Peroxydase, sondern um eine Verlangsamung derjenigen Reaktionen, welche bei Gegenwart von Sauerstoff zu einer Vermehrung der Peroxydase führen (Fig. 1).

11. Der „negative" Einfluß der Wellenlänge des Lichts

bei schwachen Intensitäten ist ebenfalls von der Belichtungsdauer abhängig, indem bei längerer Belichtung ebenfalls „positive" Lichtwirkungen an Stelle der „negativen" treten. Während der ersten Belichtungsstunden (Auerlicht) hinderte gelbes und violettes Licht noch stärker als gemischtes. Hierauf begünstigt in späteren Stadien gelbes Licht stärker die Peroxydasenbildung als violettes, ja bei frischen Extrakten sogar stärker als Dunkelheit und gemischtes Licht. Früher bei frischen als bei alten Extrakten werden sodann die Einflüsse farbigen Lichtes einander entgegengesetzt, insofern als Violett wie gemischtes Licht fördernde „positive" Wirkungen, Gelb dagegen wie Dunkelheit hindernde oder „negative" Wirkungen auf den Peroxydasengehalt der Extrakte ausübt. Nähere Einzelheiten dieser ziemlich komplizierten Verhältnisse sind in den beschriebenen Versuchen einzusehen (hierzu Fig. 2 und 3). — Es werden einige Einwände gegen die Eindeutigkeit dieser Resultate, fernerhin einige sehr allgemeine Vermutungen über die chemische Natur der negativen Lichtwirkungen erörtert.

12. Die wichtigsten Resultate der über „positive" Lichtwirkungen angestellten Versuche sind folgende.

Direktes Sonnenlicht oder intensives diffuses Tageslicht beschleunigen sofort die natürliche Peroxydasenvermehrung tierischer Extrakte in Gegenwart von Sauerstoff. Bereits nach 5 Minuten Sonnenbelichtung läßt sich zuweilen bei frischen Extrakten (Darminhalt hungernder Mehlwürmer, überwinternder und hungernder Dytiscus und Hydrophilus, Hämolymphe der letzten beiden sowie ausgewachsener Cossusraupen, überwinternde Porthesiaräupchen) ein deutlicher Unterschied $H \geq D$ nachweisen. Diese Unterschiede treten schneller und intensiver bei frischen als bei alten Extrakten auf. Ferner zeigen verdünntere Extrakte stärkere „positive" Lichtwirkungen als konzentriertere. Morgenlicht scheint besonders intensive „positive" Lichtwirkungen hervorzurufen. Ein einziges Mal gelangten bei einem frischen Extrakt auch nach sechsstündiger Belichtung mit Auerlicht „positive" Lichtwirkungen zur Beobachtung.

13. Was den Einfluß der Wellenlänge anbetrifft, so ergibt sich bei Sonnenlicht oder intensiverem diffussem Licht für die „positiven" Lichtwirkungen sofort die Reihenfolge $V > H \geq$

$D > G$. Meist ist der Unterschied zwischen V und H auf der einen Seite, D und G auf der anderen Seite besonders groß, eine Gruppierung, welche oben bereits für die zerstörenden Wirkungen des Lichtes auf die Katalase gefunden wurde. Frische Extrakte zeigen intensivere „positive" Wirkungen als ältere; desgleichen verdünntere eine stärkere Wirkung als konzentriertere. Nähere Einzelheiten sind bei den Versuchen selbst einzusehen.

14. Es wird auf eine interessante Erscheinung aufmerksam gemacht, welche an „Erholungs"-Erscheinungen insofern erinnert, als ein durch starke Belichtung in seiner Peroxydasenvermehrung beschleunigter Extrakt diese sistiert oder doch sehr verlangsamt, falls die Belichtung plötzlich wieder abgeschwächt wird, verglichen mit einem, unter gleichen Bedingungen gehaltenen verdunkelten Extrakt. Der „positive" Unterschied $H < D$ verwandelt sich m. a. W. bald nach Verringerung oder Entziehung der Belichtung in $H \sim D$ oder $D > H$.

15. Bei sehr langer Belichtung (über 6—8 Tage) nimmt der Peroxydasengehalt des belichteten Extrakts wieder ab, und zwar schneller als der eines unter gleichen Bedingungen gehaltenen verdunkelten Extrakts. Allgemein ist zu beobachten, daß tierische peroxydasehaltige Extrakte unter Chloroformzusatz und bei beliebigen Belichtungsbedingungen mit der Zeit ihren Peroxydasengehalt verlieren.

Auch über den Einfluß der Belichtung auf den Peroxydasengehalt lebender Porthesiaräupchen wurden Versuche angestellt.

16. In derselben regelmäßigen Weise, in welcher bei Belichtung (helles diffuses Tageslicht oder direktes Sonnenlicht) der Katalasengehalt lebender Porthesiaräupchen zerstört wird, vermehrt sich der Peroxydasengehalt derselben.

17. Was den Einfluß der Wellenlänge des Lichtes anbetrifft, so begünstigt bei nicht zu langer Exposition violettes Licht in ähnlicher, aber stets etwas schwächerer Weise wie gemischtes Licht die Vermehrung der Peroxydase. Im Gegensatz hierzu wirkt gelbes Licht ähnlich wie Lichtentziehung (Dunkelheit), hindert sogar die Peroxydasenentwicklung im lebenden Tierkörper in etwas mehr als der Hälfte der untersuchten Fälle noch stärker als Lichtentziehung.

18. Es stellt sich ferner eine fast vollkommen genaue

Parallele zwischen dem zerstörenden Einfluß der Spektralbezirke auf die Katalase und dem entwickelnden oder vermehrenden Einfluß derselben auf die Peroxydase heraus. Diese Parallele ist auch unter verschiedenartigen Belichtungsbedingungen und insbesondere auch bei variierender Belichtungsdauer immer vorhanden. In einigen Fällen ist die Übereinstimmung absolut, in anderen Fällen variiert nur die Stellung der Belichtungsbedingungen innerhalb der zugeordneten Paare H, V und D, G. Nie findet ein Springen aus einem Paare in das andere statt.

19. Was die Beziehungen zwischen der Sterblichkeit der hungernden belichteten Räupchen und dem Einfluß des Lichtes auf den Peroxydasengehalt anbetrifft, so ergaben sämtliche Versuche, daß im gemischten Licht, in welchem die Räupchen am längsten leben, stets der höchste Peroxydasengehalt festgestellt werden konnte. Auf der anderen Seite entsprach der im Gelb beobachteten größten Sterblichkeit in der Mehrzahl der Fälle auch der kleinste Peroxydasengehalt. Eine Parallele zwischen der Wirkung des violetten Lichtes und der Lichtentziehung auf den Peroxydasengehalt und die Sterblichkeit läßt sich auf Grund der bisherigen Versuche mit Deutlichkeit nicht erkennen.

20. Im IV. Teile der Abhandlung wird die Rolle dieser oxydativen Fermente, sowie ihrer Eigenschaften, soweit sie bis jetzt geschildert wurden, bei den phototropischen Reaktionen der Tiere diskutiert. Die Einzelheiten dieser Diskussion lassen sich in extenso nicht wiedergeben und müssen im Text eingesehen werden. Das allgemeine Resultat dieser Diskussion besteht indessen darin, daß die gefundenen Tatsachen durchaus die Annahme unterstützen, daß die phototropischen Reaktionen der Tiere im engsten Zusammenhang mit den Vorgängen der allgemeinen Gewebeatmung stehen. Weiterhin ergibt sich, daß positiv und negativ phototropische Tiere sehr scharf in bezug auf das Konzentrationsverhältnis der in ihnen enthaltenen Katalase und Peroxydase charakterisiert werden können, insofern als positiv phototropische Tiere außerordentlich katalasereich, aber sehr peroxydasearm, negativ phototropische Tiere dagegen sehr peroxydasereich und relativ katalasearm sind. Die entsprechenden positiv und negativ phototropischen Bewegungen führen zu

einer Annäherung dieser beiden Ungleichgewichte aneinander sowie zur Herstellung eines physiologischen Gleichgewichtes oder mittleren Wertes des Konzentrationsverhältnisses der zwei Oxydasen. Daß tatsächlich auf diesen zwei entgegengesetzten Wegen eine Ännäherung an ein physiologisches Gleichgewicht stattfindet, geht daraus hervor, daß bei Ausschaltung sekundärer Beeinflussungen die phototropischen Reaktionen in der Tat lebenserhaltende Vorgänge sind: Hungernde Porthesiaräupchen (intensiv positiv phototropisch) leben länger im gemischten Licht als unter allen anderen Belichtungsbedingungen; hungernde Mehlwürmer (intensiv negativ phototropisch) sterben schneller bei Belichtung als im Dunkeln.

21. Es wird auf den Einfluß des Nervensystems bei den phototropischen Reaktionen hingewiesen und die Möglichkeit erwogen, daß in ähnlicher Weise wie, z. B. die Magensaftsekretion nervös beeinflußbar ist, auch die Produktion von oxydativen Fermenten abhängig von der Mitwirkung des Nervensystems resp. der lichtempfindlichen Organe ist. Neben anderen im Text einzusehenden Gründen spricht für diese Möglichkeit die parallele weite Verbreitung einerseits der untersuchten zwei oxydativen Fermente, andererseits der phototropischen Reaktionsfähigkeit usw.

Es wird eine weitere Abhandlung, deren experimentelle Grundlagen zum größeren Teile fertig sind, in Aussicht gestellt. Eine ausführliche Parallelisierung der phototropischen Erscheinungen mit den Eigenschaften und der Verbreitung der tierischen Oxydasen soll nach Erscheinen jener zweiten Abhandlung vorgenommen werden.

Die in vorliegender Arbeit beschriebenen Versuche wurden zum Teil im Laboratorium des Zoologischen Institus der Universität Leipzig, zum Teil im Privatlaboratorium meines Vaters Wilhelm Ostwald angestellt. Es ist mir ein Vergnügen, dem Direktor des Zoologischen Instituts Herrn Geheimrat C. Chun für die mir zur Verfügung gestellten Hilfsmittel des Instituts herzlich zu danken.

Nachtrag.

Die Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit ist infolge des Umstandes, daß sie die Habilitationsschrift des Verfassers bildet, mehrfach verzögert worden. Die in dieser Arbeit geschilderten Versuche waren zum größten Teile bereits im Sommer 1907 beendet worden. In den letzten Monaten sind nun einige Arbeiten erschienen, welche z. T. ähnliche Probleme behandeln, und welche daher kurz hier erwähnt werden sollen.

Von Zeller und Jodlbauer sowie von Jamada und Jodlbauer erschienen vor kurzem in dieser Zeitschrift (8, 61—83, 84—97) zwei Mitteilungen, in welchen die Wirkung des Lichtes auf Katalase und Peroxydase sowie der Einfluß sensibilisierender Stoffe bei der Lichtwirkung untersucht wurden. Hier ist von besonderem Interesse einerseits, daß die Katalase (Hämase) in ähnlicher Weise wie in meinen Versuchen stets durch Licht (Sonnenlicht, Quecksilberlicht) zerstört wurde, sowie andrerseits, daß die von diesen Autoren gewählte Peroxydase aus der Meerrettichwurzel sowohl durch Sonnenlicht als auch durch Quecksilberlicht vernichtet wurde. Weiterhin ist auch ein kurzes Referat über die Lichtwirkung auf Katalasen und Peroxydasen des Blutes von G. Lockemann (nach einem Vortrag) erschienen (Münch. med. Wochenschr. 1907, 2162), in welchem über Untersuchungen berichtet wird, die im Gegensatz zu den Versuchen von Jamada und Jodlbauer sowie in Übereinstimmung mit meinen Befunden über „positive Lichtwirkungen" auf tierische Peroxydasen eine Verstärkung der Peroxydasenreaktion durch vorherige Belichtung ergaben. Nähere Angaben über die Intensität der benutzten Lichtquelle fehlen einstweilen. Interessant ist aber weiterhin, daß Lockemann für den Einfluß des NaCl auf Katalase- und Peroxydasereaktion genau ein reziprokes Verhalten fand.

Jamada und Jodlbauer sind der Ansicht, daß die Ursache der Verschiedenheit der Resultate in bezug auf die Wirkung des Lichts auf peroxydasehaltige Extrakte in der Gegenwart eines Peroxydasenzymogens in den Extrakten zu suchen ist, welch letzteres ev. durch Belichtung aktiviert wird. In der Tat scheint auch mir, wie aus den obigen Untersuchungen an mehreren Stellen hervorgeht, diese Annahme ziemlich gerechtfertigt. Indessen glaube ich, daß noch ein anderer Umstand, welcher von den genannten Autoren ebenfalls gestreift wird, an der Verstärkung der Peroxydasenreaktion durch Belichtung beteiligt ist, nämlich die gleichzeitige Zerstörung der Katalase durch das Licht. Wie schon oben erwähnt, ist von W. Ewald gezeigt worden, daß die Reduktion des Oxyhämoglobins abhängig von der gleichzeitig vorhandenen Katalase ist, und in neuester Zeit sind diese Versuche von Herlitzka[1]) modifiziert, wiederholt und bestätigt worden. Es besteht

[1]) Herlitzka, Atti R. Acc. dei Lincei Roma (5) 16, II, 473 ff. — Mir steht nur das Referat in Chem. Centralbl. 1908, 1, 142 zur Verfügung.

nach diesen Versuchen (ich selbst habe unterdessen ähnliche Erfahrungen machen können) zweifellos ein Antagonismus zwischen den Wirkungen der Katalase und Peroxydase, zum wenigsten im Reagensglas. Auch der reziproke Einfluß von NaCl usw. auf beide Fermente (nach Lockemann) sowie z. B. der bei den „positiven" Lichtwirkungen in den obigen Untersuchungen zutage getretene Antagonismus in der Wirkung der Wellenlänge des Lichts usw. muß in diesem Sinne herangezogen werden. Ich glaube jetzt schon sagen zu können, daß auch der Einfluß verschiedenartiger Gifte auf beiderlei Fermente ebenfalls in vielen Beziehungen ein reziproker ist.

Studien in der Chlorophyllgruppe.

Von

L. Marchlewski.

Über die Einwirkung von Säuren auf Chlorophylle.

Von

Lad. Hildt, L. Marchlewski und J. Robel.

(Vorgelegt der Akademie der Wissenschaften zu Krakau.)

(Eingegangen am 1. April 1908.)

Historisches.

Meine für den 8. Band des Handbuches der organischen Chemie von Roscoe-Schorlemmer-Brühl[1]) verfaßte Monographie über Chlorophyll habe ich mit einem „Überblick" abgeschlossen, aus welchem ich folgende Sätze zitieren möchte:

„Chlorophyll wurde frei von irgendwelchen gefärbten Beimengungen dargestellt; es ist unbekannt, inwieweit das erhaltene Produkt durch farblose Beimengungen verunreinigt ist. Die Frage, ob Chlorophyll zu den Lezithinen zu zählen ist oder nicht, ist noch als offen zu bezeichnen um so mehr, als auch die bis jetzt benutzte Methode der Reindarstellung des Phylloxanthins (welches sich angeblich wie ein Lezithin verhält[2]) keine Garantie der Abwesenheit von beigemischten farblosen Lezithinen gewährt.

Unter dem Einfluß von Säuren wird das Chlorophyllmolekül so weit verändert, daß ein Alkalizusatz Chlorophyll nicht mehr regenerieren kann. Als erstes Säureeinwirkungsprodukt ist Phylloxanthin zu betrachten, als nächstes Phyllocyanin. Letzteres

---

[1]) Verlag von Vieweg u. Sohn, Braunschweig 1901.

[2]) Bode, Bot. Centralbl. 20, 227.

entsteht aus dem ersteren, es bleibt aber noch zu erklären, warum die Umwandlung des Chlorophylls in Phyllocyanin über Phylloxanthin, wie es scheint, weit leichter stattfindet als die Bildung des Phyllocyanins aus dem Phylloxanthin. Beim Lösen des Phyllocyanins in Alkalien oder beim Erhitzen desselben mit Säuren entsteht Phyllotaonin. Dieser Schluß stützt sich vorderhand hauptsächlich auf spektroskopische Beobachtungen und ist durch eingehende Studien zu erhärten.

Siedende Alkalien zersetzen Chlorophyll — Alkachlorophyll liefernd, welches bei der Säurewirkung nicht Phylloxanthin oder Phyllocyanin, sondern Phyllotaonin resp. seine sog. Äther liefert. Alkachlorophyll steht in keiner einfachen Beziehung zum Phyllocyanin, letzteres läßt sich nicht in das erstere durch Alkalizusatz oder ersteres in letzteres durch Säurezusatz überführen. Bariumhydrat, zu Chlorophyll zugesetzt, verursacht eine Veränderung des Chlorophylls. Die Beziehung des entstehenden Körpers zum Alkachlorophyll ist noch unklar.

Ob die sog. Äther des Phyllotaonins wirklich diese Bezeichnung beanspruchen können, ist höchst wahrscheinlich, aber noch nicht genau genug bewiesen. Die Hauptstütze dieser Annahme ist die, daß das Äthylphyllotaonin, welches seiner Bildung nach diesen Namen mit vollem Recht beanspruchen kann, ein ganz analoges spektroskopisches Verhalten aufweist.

Phyllocyanin, bei nicht zu hohen Temperaturen mit Alkalien erhitzt, liefert Phyllorubin, bei hohen Phylloporphyrin, welches auch direkt aus Phyllocyanin bei höheren Temperaturen entsteht. Phylloporphyrin und Hämatoporphyrin sind chemisch nahe verwandte Körper. Es wird angenommen, daß die beschriebenen Körper sämtlich Derivate einer und derselben Substanz sind. Streng genommen wird diese Annahme erst dann berechtigt sein, wenn das rein isolierte Chlorophyll dieselben Produkte liefern wird, wie die Chlorophyllextrakte. Endlich wurde erwiesen, daß Chlorophyllderivate bei der trokkenen Destillation bei Anwesenheit von Zinkstaub Pyrrol bzw. seine Homologe liefert."

Seit jener Zeit konnte ich mich selbst, infolge des zeitweisen Überganges in die Technik und später durch amtliche Beschäftigungen verhindert, mit dem fascinierenden Problem der Chemie des Chlorophylls nur sporadisch beschäftigen. Es gelang

aber doch in einigen weiteren Punkten Klarheit zu schaffen, und zwar vor allem durch die Untersuchungen von Nencki über den Blutfarbstoff, an dessen Chemie durch die bewiesene nahe Verwandtschaft des Phylloporphyrins und Hämatoporphyrins die Chemie des Chlorophylls sich anlehnte. Zunächst gelang es nachzuweisen,[1]) daß das Hämopyrrol, wie zu erwarten war, nicht nur aus Blutfarbstoffderivaten, sondern auch aus Chlorophyllderivaten, speziell aus dem Phyllocyanin gewonnen werden kann. Die Identifizierung beider Produkte geschah zwar damals vielleicht nicht mit genügender Genauigkeit; sie stützte sich auf die Zusammensetzung des Doppelsalzes des Hämopyrrols mit Quecksilberchlorid, einer Verbindung, die ohne besondere Reinigungen zur Analyse gelangen mußte, aber die sonstigen Eigenschaften beider Produkte sind in allen Stücken identisch, so daß an die Identität beider auf Grund der damals beschriebenen Versuche nicht zu zweifeln war. Ich bemühte mich jedoch weitere, präzisere Reaktionen zur Identifizierung zu finden, welche gleichzeitig den Zweck hatten, die Pyrrolnatur des Hämopyrrols außer Zweifel zu lassen, zumal von anderer Seite[2]) die Möglichkeit, daß dieser Körper Hexahydroisoindol wäre, diskutiert wurde. Ich konnte mit meinen Mitarbeitern[3]) nachweisen, daß Hämopyrrol leicht mit Diazoniumsalzen reagiert, ein Umstand, welcher mit der Hexahydroisoindolkonzeption nicht gut zu vereinbaren war, hingegen von der Pyrrolhypothese direkt gefordert wurde. Seit jener Zeit hat Küster[4]) seine Annahme fallen lassen und die Pyrrolkonzeption seinerseits unterstützt, nachdem es ihm gelang, durch Anwendung der Oxydation, welche ihm im Gebiet der Häminforschung so schöne Resultate gegeben hat, nachzuweisen, daß Hämopyrrol in Methyläthyl-Maleinsäureanhydrid überführt werden kann, sich also ebenso verhält wie andere Pyrrolhomologe nach früheren Versuchen von Plancher[5]). Danach wäre

[1]) Nencki und Marchlewski, Bull. de l'acad. des Sciences de Cracovie 1901.

[2]) Küster, Zeitschr. f. angew. Chem. 19, Heft 6.

[3]) Marchlewski mit Goldman, Hetper, Retinger, Mostowski, Buraczewski, Bull de l'acad. des Sciences de Cracovie 1905, 279; 1906, 13. Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 182; 51, 464, 1907.

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 2017, 1907.

[5]) Atti R. Accad. dei Lincei Roma [5], 13, I, 489.

Hämopyrrol als β, β-Methyl-Äthyl-Pyrrol anzusprechen, während die Analysen des obenerwähnten Azofarbstoffes viel besser auf Methyl-Propyl-Pyrrol passen. Die Eigenschaften des Chlorohydrates des Hämopyrrol-Disazo-Dibenzols sind sehr charakteristisch und es konnte auch zur Identifizierung des aus Phyllocyanin erhaltenen Produktes dienen. Die einschlägigen Versuche, die leider noch nicht abgeschlossen werden konnten, zeigen in der Tat, daß auch das Chlorophyllpyrrol mit Diazoniumsalzen reagiert und ein ganz analoges, höchstwahrscheinlich identisches Produkt, wie das Hämopyrrol liefert.

Eine weitere Phase in der Chlorophyllforschung wurde durch eine Entdeckung auf dem Gebiete der Blutfarbstoffforschung, nämlich die des Mesoporphyrins durch Nencki und Zaleski[1]) veranlaßt, während welcher nachgewiesen werden konnte[2]), daß speziell auf Grund des Verhaltens dem Brom gegenüber, Phylloporphyrin dem Mesoporphyrin noch näher steht als dem Hämatoporphyrin, und durch die Tatsache, daß Phylloporphyrin bei der Oxydation Hämatinsäure liefert[3]).

Die Entdeckung des Phylloerythrins[4]) und der Beweis,[5]) daß dieser prächtig krystallisierende Körper identisch mit dem Cholehämatin von Mac-Munn bzw. dem Bilipurpurin[6]) von Löbisch ist, bildete einen kleinen Beitrag zur Aufklärung der Umwandlung des Chlorophylls im tierischen Organismus.

Besonders hervorheben möchte ich einen weiteren Beweis[7]) der nahen Verwandtschaft des Hämatoporphyrins und Phylloporphyrins, welcher durch die Tatsache geliefert wird, daß Phylloporphyrin unter bestimmten Bedingungen in ein eisenhaltiges Derivat umgewandelt werden kann, welches sich spektroskopisch genau wie das Teichmannsche Hämin verhält.

Die obige Skizze gibt eine annähernde Zusammenstellung derjenigen Arbeiten über Chlorophyll, welche ich selbst bis zum Jahre 1906 ausführen konnte.[8]) Durch die Übernahme des

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1901, 997.
[2]) Marchlewski, Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1902, 223.
[3]) Marchlewski, Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1902, 1.
[4]) Marchlewski, Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1903, 636.
[5]) Marchlewski, Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1904, 276.
[6]) Marchlewski, Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1904, 505.
[7]) Marchlewski, Diese Zeitschr. 3, 320, 1907.
[8]) Vergl. auch noch diese Zeitschr. 3, 302, 1907.

Lehrstuhls für mediz. Chemie an der hiesigen Universität ist die Möglichkeit, dem Problem mehr Zeit zu schenken, etwas gestiegen, aber erst dank dem Senat der Universität und der Akad. der Wissenschaften in Krakau konnten Apparate und Mittel beschaffen werden, welche es gestatteten, wenigstens in bescheidenem Umfange die früher berührten aber nicht erledigten Probleme von neuem in Angriff zu nehmen.

Ehe ich zur Besprechung meiner letzten Resultate übergehe, sei mir gestattet auf eine Reihe von bedeutenden Arbeiten über Chlorophyll hinzuweisen, welche wir Willstätter[1]) verdanken.

Dieselben bilden zum Teil eine Bestätigung des Hauptresultates Schuncks, und Schuncks und meiner Bemühungen um die Sache, nämlich der chemischen Verwandtschaft des Blut- und Blattfarbstoffes, sowie auch des Beweises der grundverschiedenen Umänderungen, welche Chlorophyll unter dem Einfluß von Säuren und Alkalien erleidet. Die Ansichten bezüglich dieses letzteren Punktes waren sehr verschieden, und ich erspare mir hier ausführlich auf die vielen harten Kämpfe hinzuweisen, die ausgefochten werden mußten, um die Sache zu erledigen.[2]) Die leichte Zersetzlichkeit des Chlorophylls zwang uns immer frisches Material in Arbeit zu nehmen, da nur in dieser Weise den Argumenten unserer Gegner entgegengetreten werden konnte, daß die von uns erhaltenen Resultate nicht vergleichbar seien. Wie sehr die erhaltenen Resultate von der Behandlungsart des Ausgangsmaterials abhängig sind, zeigen übrigens auch Willstätters Angaben sehr deutlich. Während die von ihm und seinen Mitarbeitern aus rohen, durch Pflanzensäuren bereits veränderten Pflanzenextrakten erhaltenen Phytochlorine im Maximum zirka 9% Stickstoff enthalten, gab ihnen das sog. Phäophytin, welches durch Oxalsäurezusatz zu möglichst wenig veränderten Chlorophyllextrakten erhalten war, unter analogen Bedingungen ein Phytochlorin von derselben Basizität, welches nahezu

---

[1]) Liebigs Annalen 350, 1, 48; 354, 205; 358, 205, 267.

[2]) Marchlewski, Untersuchungen über Chlorophyll und seine Derivate, Bot. Centralbl. 20, 221, 1899. — Zur Chemie des Chlorophylls, Journ. f. prakt. Chem. 60 (2), 91, 1899. — Fortschritte und Rückschritte auf dem Gebiete der Chlorophyllforschung, Chem.-Zeitg. 23. No. 67, 1899. — Schlußbemerkungen zu den Arbeiten von Bode und Kohl über Chlorophyll.

11% Stickstoff enthielt, und inwieweit die spektroskopischen Verhältnisse dieser Substanzen differieren, ist vorläufig noch unbekannt. Zu Anfang der Bearbeitung der Chlorophyllchemie war es also jedenfalls notwendig, mit möglichst wenig veränderten Chlorophyllösungen zu arbeiten, die durch Anwendung entsprechender säurefreier Pflanzen hergestellt waren. Im Gegensatz zu dem Säureeinwirkungsprodukt des Chlorophylls gibt das Alkachlorophyll nach Willstätter nicht Phytochlorine, sondern Phytorhodine, wodurch er die große Differenz in dem Verhalten des Chlorophylls und des Alkachlorophylls von neuem beweist. Die hierbei erzielten Phytorhodine unterscheiden sich sehr auffallend von dem Phyllotaonin, welches bei niedriger Temperatur aus Alkachlorophyll gewonnen wird und welches sich, wie ich mit Koźniewski[1]) gezeigt habe, äußerst leicht in eine andere, optisch scharf sich unterscheidende Abart, das sog. Allophyllotaonin, umwandelt.[2])

Das Alkachlorophyll hat Willstätter weiterhin der Einwirkung von Alkalien bei hohen Temperaturen unterworfen und dabei eine Substanz erhalten, die er Alloporphyrin nennt. Dieselbe Reaktion wurde bereits von Tschirch[3]) studiert, und dieser Forscher hat den entstehenden roten Körper Phyllopurpurinsäure genannt. Nach der Entdeckung des Phylloporphyrins habe ich nach Tschirch diese Reaktion wiederholt,[4]) wobei es mir allerdings nur darauf ankam, zu untersuchen, ob hier tatsächlich ein Körper entsteht, welcher, wie Tschirch behauptete, dem Chlorophyll viel näher steht als Phylloporphyrin, weil es noch ein Band im roten Teil des Spektrums besitzen sollte. Meine Untersuchung führte mich zu dem Schluß, daß in dieser Beziehung Tschirch irrte, daß hier vielmehr ein Körper entsteht, welcher nach entsprechender Reinigung ein Spektrum zeigte, welches ich für identisch mit dem des Phylloporphyrins hielt. Willstätter isolierte die Phyllopurpurinsäure in größerer Menge und konnte nachweisen, daß, ob-

[1]) Journ. f. prakt. Chem. 61 (2), 47, 1900.

[2]) Neuerdings haben Koźniewski und Marchlewski gezeigt, daß Allophyllotaonin sehr leicht in Phytorhodine übergeführt werden kann. Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1908, Heft 4.

[3]) Untersuchungen über das Chlorophyll, Berlin 1884.

[4]) Zeitschr. f. prakt. Chem. 1896, 422.

wohl die optischen Eigenschaften derselben denen des Phyllo-porphyrins analog sind, das sonstige Verhalten jedoch entschieden gegen die Idendität beider Substanzen sprach. Willstätter gibt also zu den vielen bereits bekannten, von mir und Schunck und mir selbst gelieferten Beweisen der chemischen Verwandschaft des Chlorophylls und Blutfarbstoffs noch einen weiteren, nämlich, daß Phyllopurpurinsäure isomer mit Mesoporphyrin ist.

Als die grundsätzlich neue Entdeckung Willstätters auf dem Gebiet der Chlorophyllforschung muß der Beweis angesehen werden, nach welchem Chlorophyll magnesiumhaltig ist. Auch früher wurde allerdings vermutet, daß Magnesium stets im Blattgrün vorhanden ist, einen strikten Beweis gab es jedoch nicht. Willstätter knüpfte an diese Entdeckung eine geistreiche Hypothese über die Rolle des Magnesiums in der Pflanze und meint, die Kohlensäureaufnahme in der Pflanze ist wahrscheinlich ein Prozeß wie die Grignardschen Synthesen. Dadurch wird wieder die chemische Rolle der Chlorophylle im Assimilationsprozeß diskutabel, was unstreitig von wissenschaftlichem Werte ist. Hingegen vermag ich das abfällige Urteil Willstätters an Nenckis Hypothese bezüglich der großen biologischen Bedeutung der Entdeckung der Stammverwandtschaft des Chlorophylls und Blutfarbstoffs nicht teilen. Seit jener Hypothese hat sich in der Chlorophyllchemie nichts grundsätzlich geändert,[1]) und daß die Pflanze vorwiegend synthetisierend wirkt und der Tierorganismus vorwiegend analysierend, ist ja längst bekannt. Tatsache ist, daß die Werkzeuge des großartigsten Synthetikers und nicht minder mächtigen Analytikers chemisch analog gebaut sind, und wir bewundern das Anpassungsvermögen der Natur, durch welches grundverschiedene Vorgänge mittels analoger Grundsubstanzen ausgelöst werden können. Die Existenz des synthetisierenden Farbstoffs in der Periode der Alleinherrschaft der Pflanzenwelt enthielt bereits die Möglichkeit der Entstehung des analysierenden Komplementfarbstoffes.

---

[1]) Herr A. Rossel, Berichterstatter der „Neuen Züricher Zeitung" ist allerdings nicht derselben Meinung. Da aber die Ansichten dieses Herrn auch in anderen Sachen grundverschieden von den anderer Leute sind (er koordiniert den Atmungsprozeß der Pflanzen mit dem Chlorophyllmolekül) so wird man auch über jene kein Wort zu verlieren brauchen. Zudem hat er Nencki vollständig mißverstanden.

Die obige historische Skizze erleichtert das Verständnis und erklärt den Zweck meiner und meiner Mitarbeiter weiteren Untersuchungen über Chlorophyll, deren Resultate ich im nachfolgenden beschreiben möchte.

Über Chlorophyllan, Phäophytin und Phyllogen.

Hoppe-Seyler[1]) war der erste, der das Chlorophyll durch chemische Untersuchung seiner Derivate erforschen wollte. Es gelang ihm, durch Konzentrieren in der Hitze erzeugter Chlorophyllauszüge ein Produkt zu erzeugen, welches angeblich krystallisierte, durch ziemlich markante optische Eigenschaften ausgezeichnet war und welches den Namen Chlorophyllan erhielt. Diese Substanz wurde später von verschiedenen Forschern untersucht, und Tschirch[2]) gebührt das Verdienst bewiesen zu haben, daß bei der Bildung des Chlorophyllans die Pflanzensäuren eine wichtige Rolle spielen. Artur Meyer[3]) erhielt Chlorophyllan durch direkte Behandlung von Blättern mit Eisessig. Die analytische Untersuchung des Chlorophyllans gab Hoppe-Seyler Resultate, welche in der einschlägigen Literatur viel besprochen wurden, da sie scheinbar für die Annahme eintraten, daß Chlorophyll zu den Lezithinen zu zählen ist. Das Chlorophyllan erwies sich nämlich als aschenhaltig, und zwar phosphorhaltig. Für mich hat dieser Aschenbefund nicht als, beweisend gegolten,[4]) denn es war durchaus nicht ausgeschlossen daß dem Farbstoff noch farblose Beimengungen anhaften konnten, welche die Asche bedingen würden. Die angebliche leichte Reinigung des Chlorophyllans durch Krystallisation erscheint in ganz anderem Lichte, wenn man selbst einmal diese „Chlorophyllankrystalle" beobachtet hat. Eine krystallinische Struktur ist bei den Chlorophyllanpräparaten überhaupt nicht zu konstatieren. Ich selbst hielt das Chlorophyllan für ein Gemisch von verschiedenen Farbstoffen und verteidigte die Annahme gegenüber verschiedenen Angriffen. Gegen die Einheitlichkeit des Produktes sprachen verschiedene Umstände, vor allem eine ge-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 339, 1879; 4, 193, 1880; 5, 75, 1881.
[2]) Untersuchungen über das Chlorophyll, Berlin 1884.
[3]) Bot. Zeitschr. 1882, 533.
[4]) Vergl zit. Monographie.

wisse Variabilität der spektralen Eigenschaften von Präparaten, die aus derselben Pflanze und nach derselben Methode hergestellt waren, und später, nachdem ich mit C. A. Schunck[1]) ausführlich die Hauptresultate Sorbys[2]) über das Vorkommen zweier Chlorophylle bestätigen konnte, die Überzeugung, daß die Wirkung der Säuren sich nicht auf die Umänderung nur eines der beiden grünen Farbstoffe beschränken wird. Bereits Sorby[3]) hat nämlich die Veränderung seines gelben Chlorophylls unter dem Einfluß von Säuren hervorgehoben, welche allerdings etwas träger verläuft als im Falle des „blauen" Chlorophylls.

Ein Produkt, welches dem Chlorophyllan sehr ähnlich ist, wurde später von Schunck und dann von Schunck und mir zur Darstellung verschiedener Chlorophyllpräparate benutzt. Dasselbe wurde erhalten, indem Chlorophyllextrakte, welche mit 82% Alkohol hergestellt waren mit gasförmiger Salzsäure kurze Zeit behandelt wurden. Die gasförmige Chlorwasserstoffsäure wurde einer wässerigen Lösung nur aus dem Grunde bevorzugt, um eine unnötige Verdünnung der Chlorophyllösung, welche eine Abscheidung von Pflanzensäuren und Fetten verursachen würde, zu vermeiden. Es entsteht hierbei eine braunschwarze Fällung, welche sich schnell zu Boden setzt, in den gebräuchlichen Lösungsmitteln leicht löslich ist und optisch sehr an das Chlorophyllan erinnert. Wir hielten die Substanz für nicht einheitlich und unterließen es, dieselbe einem gründlichen Studium zu unterwerfen, um so mehr, als Darstellungen aus verschiedenen Pflanzen nicht immer zu demselben Produkte führten. Da dasselbe jedoch als Ausgangsprodukt für Phylloxanthin und Phyllocyanin häufig benutzt wurde, so erhielt es der Kürze wegen den Laboratoriumsnamen Phyllogen.

Im vorigen Jahre endlich beschrieben Willstätter und Hocheder[4]) unter dem Namen Phäophytin Substanzen, welche sie durch Einwirkung von Oxalsäure auf konzentrierte Chlorophyllextrakte erhielten. Bereits die Darstellungsart, sowie auch die Eigenschaften dieser Phäophytine machten es für mich evident,

[1]) Journ. of the Chem. Soc. 77, 1030, 1900.
[2]) Proc. Roy. Soc. 21, 442.
[3]) Proc. Roy. Soc. 21, 442.
[4]) Liebigs Annalen 354, 205, 1907.

daß diese Substanzen mit den obenerwähnten Salzsäureniederschlägen identisch sind, und da andererseits die „Phyllogene" in engster Beziehung zum Chlorophyllan stehen, so machte sich der Wunsch rege, sämtliche Substanzen durch direkte Beobachtungen zu vergleichen und in dieser Richtung einheitliche Ansichten zu schaffen.

Darstellung des Phyllogens aus Ahornblättern.

Zur Darstellung des Phyllogens aus Ahornblättern wurde zum Teil Chlorophyllextrakt aus frischem Material und zum Teil aus getrocknetem und dann gepulvertem benutzt. Ersteres wurde bei Wasserbadtemperatur mit 82% Alkohol, letzteres in der Kälte mit 96% Alkohol extrahiert. In beiden Fällen wurden Doppelextrakte hergestellt. Der in der Wärme dargestellte Auszug wurde nach dem Erkalten und Filtrieren mit gasförmiger Salzsäure lange Zeit behandelt, und zwar bis eine deutliche Reaktion zu erkennen war, und der gebildete Niederschlag auf einem Faltenfilter gesammelt und gründlich mit 82% Alkohol ausgewaschen. Weiteren Reinigungen wurde das Produkt nicht unterworfen, sondern in diesem Zustande mit anderen Präparaten verglichen.

Die kalte Extraktion geschah unter folgenden Bedingungen. 1 kg getrockneter und auf einer Excelsiormühle gemahlener Ahornblätter wurde mit 3 l Alkohol von 96% übergossen und das Gemisch während zweier Tage unter häufigem Umrühren stehen gelassen. Sodann wurde soviel als möglich Flüssigkeit abdekandiert und der Rückstand in einer hydraulischen Presse unter Anwendung von 300 Atmosphären Druck ausgepreßt. Die erhaltenen Lösungen wurden vereinigt und zur Extraktion einer weiteren Portion von $^1/_2$ kg getrockneter und gemahlener Blätter verwendet. Das zweite Extrakt wurde sodann mit 10% wässeriger Salzsäure versetzt, und zwar auf 1 l Lösung kamen 25 ccm Salzsäure zur Anwendung. Es bildete sich sofort ein dunkler braunschwarzer Niederschlag, der abfiltriert und mit Alkohol gewaschen wurde. Die weitere Reinigung dieses Niederschlages geschah auf eine Art, die von Schunck und mir bei den Äthern des Phyllotaonins benutzt wurde. Der Niederschlag wurde nämlich in Chloroform gelöst, die Lösung stark konzen-

triert und sodann mit Alkohol versetzt, wodurch das „Phyllogen" in Flocken abgeschieden wurde. In dieser Art wurde aus je 1 kg Ahornblätter nur 4,8 g Phyllogen erhalten. Phyllogenpräparate, welche analysiert werden sollten, wurden der obigen Prozedur noch zweimal unterworfen.

Das in dieser Weise gewonnene Phyllogen bildet nach dem Trocknen eine dunkel schwarzblaue Masse, die keine krystallinische Struktur aufweist. Auch bei wochenlangem Verbleiben im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure wird das Präparat nicht spröde, obwohl sein Gewicht mit der Zeit konstant wird. Beim Erhitzen im Capillarrohr schmilzt es bei ca. 130° C zu einer schwarzen Flüßigkeit zusammen. In Chloroform löst sich das Phyllogen wie gesagt äußerst leicht, in kaltem Alkohol schwer, in siedendem leichter und scheidet sich aus letzterem in Pseudokrystallen aus, welche in ihrer Gestalt lebhaft an Chlorophyllan und Pringsheims Hypochlorin erinnern. Scharfe Kanten zeigen dieselben ebensowenig wie Chlorophyllan. In Äther ist das Phyllogen ziemlich leicht löslich, in Benzol noch leichter, in Ligroin von Siedepunkt 27° sehr schwer. In seinem Verhalten diesen Lösungsmitteln gegenüber unterscheidet es sich durchaus nicht vom Phäophytin Willstätters, welches zu Vergleichszwecken aus derselben Ahornblätterpartie durch Anwendung von Oxalsäure dargestellt wurde. Beide Produkte, das Phyllogen und das Phäophytin, sind überhaupt nicht voneinander zu unterscheiden, was besonders auch durch das Studium der elementaren Zusammen setzung beider Körper wie auch ihrer spektralen Eigenschaften bestätigt wurde.

Die Elementaranalysen beider Produkte müssen besonders langsam geführt werden. Die zu verbrennenden Proben müssen für die N-Bestimmung sehr genau mit einem großen Überschuß von Bleichromat vermischt werden. Da die Phyllogen- und Phäophytinpräparate, welche aus Ahornblättern stammen, wie oben bemerkt, durch das Trocknen im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur auch nach längerer Zeit nicht spröde werden und sich daher nicht gut pulverisieren lassen, wurden die zur Analyse bestimmten Proben direkt in einem kleinen Achatmörser abgewogen und sodann in diesem mit gepulvertem Bleichromat verrieben. Trotz diesen Vorsichtsmaßregeln passierte es einige Male, daß auch bei sehr langsamer Leitung des Ver-

brennungsprozesses und trotz der Anwendung von Bleichromat die Substanz plötzlich eine kleine Menge eines brennbaren Gases abgab, welches dem Stickstoff beigemischt war.

Phyllogen erwies sich übrigens vollständig aschefrei ebenso wie Phäophytin, und da es bei der Spaltung mit konzentrierter Salzsäure unter anderem Phylloxanthin liefert, so folgt daraus, daß auch diese Substanz aschefrei zu erhalten ist.

Ein dreimal nach der obenerwähnten Methode gereinigtes Phyllogenpräparat gab bei der Analyse die folgenden Resultate:

1. 0,2309 g Subst. gaben 10,8 ccm Stickstoff bei $t = 14°$, $b = 741{,}6$ entsprechend 5,39% N,
2. 0,1649 g gaben 7,7 ccm N bei $t = 13°$, $b = 756{,}6$, entsprechend 5,52% N,
3. 0,2441 g gaben 11,4 ccm N bei $t = 13°$, $b = 737{,}2$, entsprechend 5,37% N,
4. 0,1874 g gaben 0,5132 g CO_2, 0,1475 g H_2O, entsprechend 74,69% C, 8,81% H,
5. 0,1153 g gaben 0,3162 g CO_2, 0,0917 g H_2O, entsprechend 74,79% C, 8,90% H.

Ganz analoge Resultate gab Phäophytin aus Ahornblättern. Auch diese Präparate würden dreimal unter Zuhilfenahme der Fällbarkeit der Substanz aus Chlorformlösungen durch Alkohol gereinigt.

6. 0.1218 g gaben 0,3333 g CO_2 und 0,1038 g H_2O, entsprechend 74,63% C, 8,62% H,
7. 0,1538 g gaben 7,0 ccm N bei $t = 9°$, $b = 751{,}9$, entsprechend 5,43% N,
8. 0,1218 g gaben 6,3 ccm N[1]) bei $t = 14°$, $b = 725{,}6$, entsprechend 5,75% N.

Hervorgehoben mag noch werden, daß die Zusammensetzung des Phyllogens sich nicht ändert, wenn es den obenerwähnten Reinigungsprozessen noch weiter unterworfen wird. Ein im ganzen fünfmal in Chloroform gelöstes und durch Alkohol gefälltes Präparat zeigte die nämliche Zusammensetzung:

0,1212 g gaben 0,3316 g CO_2 und 0,0950 g H_2O, entsprechend 74,62% C, 8,71% H.

Phyllogen verhält sich also auch in dieser Beziehung dem

[1]) Über der Lauge gemessen.

Phäophytin völlig analog, d. h. scheinbar ist es eine einheitliche Substanz, die sich aus Chloroformlösungen durch Alkohol niedergeschlagen nicht fraktionieren läßt.

Phyllogen aus Akazienblättern.

Die Akazienblätter waren im Hochsommer gesammelt, bei Abwesenheit von Licht getrocknet und gemahlen. Die Extraktion geschah in der Kälte und wurde übrigens ebenso geleitet wie oben beim Ahornphyllogen beschrieben. Die Ausbeute war geringer als im Falle der Ahornblätter. Die Reinigung geschah in derselben Art wie oben beschrieben. Das erhaltene Produkt war wenig vom Ahornphyllogen verschieden, nur war es weniger klebrig, sonst verhielt es sich physikalisch wie chemisch dem ersteren ganz analog. Schmelzpunkt ca. 150°. Zur Analyse wurde es im Vakuum über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht getrocknet:

1. 0,1953 g gaben 11,6 ccm N bei t = 15, b = 748,2, entsprechend 6,88% N,
2. 0,1709 g gaben 9,8 ccm N bei t = 15,25 b, = 750,4, entsprechend 6,66% N,
3. 0,1537 g gaben 9,4 ccm N bei t = 16,5, b = 748,8, entsprechend 7,06% N,
4. 0,1283 g gaben 0,3560 g CO_2, 0,0953 g H_2O, entsprechend 75,67% C und 8,26% H.
5. 0,1737 g gaben 0,4766 g CO_2, 0,1266 g H_2O, entsprechend 74,70% C und 8,14% H.

Die spektroskopischen Verhältnisse des Akazienphyllogens im weniger gebrochenen Teil des Spektrums wie auch im Ultraviolett sind denen des Ahornblätterphyllogens ganz analog.

Phyllogen aus Ficus-Repens-Blättern.

Ficus Repens-Blätter, die uns leider nur in geringer Menge zur Verfügung standen, liefern ein Phyllogen, welches von den von uns untersuchten Phyllogenen den höchsten Stickstoffwert aufweist und das sprödeste ist. Es wurde auf die übliche Art durch Einwirkung von Salzsäure auf Doppelextrakte in der Kälte erhalten und durch Fällung seiner Chloroformlösung mit

96% Alkohol gereinigt. Seine Zusammensetzung folgt aus den beigefügten Analysen:

1. 0,1023 g gaben 0,2694 g CO_2, 0,0811 g H_2O, entsprechend 71,94% C, 8,79% H,
2. 0,1154 g gaben 7,2 ccm N,[1]) t = 14, b = 740,8 ccm, entsprechend 7,12% N.

Sein allgemeiner Charakter stimmt mit dem der anderen Phyllogene genau überein. Es enthält ähnlich wie jene, oder die Phäophytine keine Asche.

Chlorphyllan aus Brennesselblättern.

Um zu prüfen, ob, wie von vornherein anzunehmen war, Chlorphyllan in naher Beziehung zum Phäophytin und Phyllogen steht, haben wir ein vor mehreren Jahren von dem einen von uns dargestelltes Chlorophyllan aus Brennesseln einer genaueren Untersuchung unterzogen. Die Darstellung desselben geschah nach der Methode von Hoppe-Seyler. Das vorliegende Präparat war ganz roh und auf den ersten Blick stark von Pflanzenfetten verunreinigt, die sich zum Teil als zarte weiße Schuppen dem dunkel blauschwarzen Farbstoff anschmiegten. Zunächst wurde versucht, dasselbe nach der Hoppe-Seyler-schen Art „umzukrystallisieren", und zwar unter Anwendung von Alkohol, allein die aus der alkoholischen Lösung beim Erkalten abgeschiedenen Massen machten nicht den Eindruck, daß sie durch den Prozeß reiner geworden sind. Es wurde daher die beim Phyllogen benutzte Methode angewandt. Das Chlorphyllan wurde in Chloroform gelöst und durch ein gehärtetes Filter filtriert. Auf dem Filter verblieb eine schwach gefärbte Masse in kleiner Menge zurück. Das Filtrat wurde stark eingeengt und mit 96% Alkohol versetzt. Das in dieser Weise abgeschiedene Chlorophyllan ließ aber immer noch Verunreinigungen erkennen. Es wurde daher von neuem in Chloroform gelöst und wieder durch ein gehärtetes Filter filtriert, das Filtrat stark konzentriert, mit Alkohol gefällt und die Fällung nach dem Abfiltrieren in siedenden Alkohol eingetragen. Während des Erkaltens dieser Lösung wurde die Abscheidung von hellen Flocken beobachtet, diese wurden schnell durch Filtration

[1]) Über Wasser gemessen.

mittels Faltenfilters entfernt und das alkoholische Filtrat eingeengt. Beim Erkalten schied sich das Chlorophyllan in sammetschwarzen, nicht zusammenhängenden Körnern ab. Es wurde von neuem in Chloroform gelöst, filtriert, das Chloroform nahezu ganz abgedampft und mit Alkohol gefällt. Dieses Produkt gab nun bei der Analyse folgende Werte:

1. 0,1256 g gaben 7,3 ccm N, $t = 13°$, $b = 744$, entsprechend 6,69% N,
2. 0,1304 g gaben 0,3604 g CO_2, 0,1007 g H_2O, entsprechend 75,23% C, 8,61% H,
3. 0,1590 g gaben 0,4362 g CO_2, 0,1240 g H_2O, entsprechend 74,85% C, 8,70% H.

Seinem allgemeinen Verhalten nach ist das in dieser Art gereinigte Chlorophyllan von dem Phyllogen, also mithin auch von dem Phäophytin nicht zu unterscheiden. Sein optisches Verhalten ist mit dem des Phyllogens identisch.

In einer wichtigen Beziehung unterschied sich das nach obiger Art gereinigte Chlorophyllan von dem Rohchlorophyllan. Während die ätherische Lösung des letzteren an eine 15%ige Salzsäure beim Schütteln etwas Farbstoff mit blaugrüner Farbe abgab, verhielt sich die ätherische Lösung des gereinigten Chlorophyllans einer Säure von obiger Konzentration gegenüber völlig indifferent. Auf diesen Unterschied kommen wir noch im folgenden Paragraphen zu sprechen.

Verhalten von Phyllogen, Phäophytin und Chlorophyllan Salzsäure gegenüber.

Phyllogen bildet bekanntlich das Ausgangsprodukt zur Darstellung des Phyllocyanins und Phylloxanthins. Die Bildung dieser Körper erfolgt, wenn man Phyllogen mit konzentrierter Salzsäure behandelt. Von der Länge der Einwirkung der Säure und der Art der Isolierungsmethode hängt die Natur der Spaltungsprodukte in gewissem Grade ab. Am eingehendsten sind bis jetzt zwei Spaltungsprodukte des Phyllogens unter der Einwirkung von Säure studiert, nämlich des Phylloxanthin und des Phyllocyanin. Beide Produkte werden demnächst genauer beschrieben. Hier sei nur darauf hingewiesen, daß Phylloxanthin weit schwächere basische Eigenschaften besitzt als das Phyllocyanin. Ersteres wird seiner ätherischen Lösung erst durch

24%ige Salzsäure in größeren Mengen entzogen, während das Phyllocyanin schon in 15%ige Salzsäure übergeht. Da das Phyllogen früher als ein Gemisch dieser beiden Substanzen angesehen wurde, so haben wir jetzt auf Grund des Verhaltens des Phyllogens zu Salzsäuren verschiedener Konzentration die Frage nach seiner Einheitlichkeit in dieser Beziehung näher studiert. Es hat sich hierbei gezeigt, daß Phyllogene verschiedenen Ursprungs sich verschieden verhalten. Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß 10 ccm einer ätherischen Lösung des Phyllogens, welche in 1 ccm 0,0003 g enthielt, mit 10 ccm Salzsäure von verschiedenen Konzentrationen kurze Zeit geschüttelt wurden. Untersucht wurden Phyllogene aus Brennnesseln, Ficus Repens, Ahornblättern und Akazienblättern. Mit Ausnahme des letzterwähnten Phyllogens verhielten sich sämtliche untersuchte Phyllogene einer 15%igen Salzsäure gegenüber indifferent. 20%ige Säure nahm schon etwas mehr Farbstoff auf, 24%ige natürlich noch mehr. Die in dieser Art erhaltenen Lösungen sind allerdings, besonders im Falle der Anwendung einer 20%igen Säure, nur sehr wenig gefärbt, und um einen besseren Vergleich erzielen zu können, haben wir die Intensität der durch die sauren Lösungen verursachten Absorptionen colorimetrisch mit Hilfe des Martens-Königschen Apparates im Natriumlicht verglichen. Die erzielten Werte sind in folgenden Tabellen zusammengefaßt:

	15%HCl		20%HCl		24%HCl	
Ursprung des Phyllogens	α_1	α_2	α_1	α_2	α_1	α_2
Brennesseln	—	—	79,95°	69,57°	82,68°	65,51°
Ficus Repens . . .	—	—	76,86°	71,51°	81,8°	68,32°
Akazienblätter . . .	75,15	73,23	85,13	62,95	93,4	55,28
Brennessel-Phyllogen nach 3stündigem Erwärmen mit ½%iger Oxalsäurelösung . . .	78,25	72,9	81,9	66,49	88,13	60,51

Werte für ε.

Brennessel erhitzt mit Oxalsäure	0,1699	0,4852	1,2286
Brennesseln	—	0,3226	0,5497
Akazienblätter . . .	0,0556	0,7776	—
Ficus Repens . . .	—	0,1561	0,4407

Eine besondere Besprechung verdient das Verhalten des Chlorophyllans. Dasselbe gibt, solange es nicht gereinigt ist, (siehe oben) an 15%ige Salzsäure ziemlich viel Farbstoff ab, hingegen das gereinigte Präparat, dessen Zusammensetzung oben angegeben wurde, verhält sich ebenso wie das Phyllogen aus derselben Pflanzenart, in diesem Falle das Brennesselphyllogen. Das Rohprodukt enthält also, wie ich dies bereits auch früher immer behauptet habe, etwas Phyllocyanin (ob es auch Phylloxanthin enthält, ist nicht sicher zu entscheiden), und durch den Reinigungsprozeß, welcher auf der Fällung des Chlorophyllans aus Chloroformlösungen durch Alkohol basiert, wird das in Alkohol löslichere Phyllocyanin entfernt. Erinnert man sich nun des Umstandes, daß Chlorophyllan insofern unter anderen Bedingungen gebildet wird als Phyllogen oder Phäophytin, als es der Wirkung von Wasserstoffionen bei höheren Temperaturen ausgesetzt ist, so kommt man zum Schluß, daß es gelingen muß, die letztgenannten Präparate durch Pflanzensäuren bei erhöhter Temperatur sozusagen in Chlorophyllan umzuwandeln. Und in der Tat zeigt die vierte horizontale Reihe der ersten oben angeführten Tabelle, daß Phyllogen, welches Brennesseln entstammt und drei Stunden lang in $^1/_2$%iger alkoholischer Oxalsäure auf dem Wasserbade erwärmt war, an 15%ige Salzsäure nach dieser Behandlung aus seiner ätherischen Lösung ziemlich viel Farbstoff abgibt. Ebenso konnten wir uns überzeugen, daß genuines Chlorophyllan, welches den Chloroform-Alkohol-Reinigungsprozeß durchgemacht hat und dessen ätherische Lösung an 15%ige Salzsäure keinen Farbstoff abgab, diese Eigenschaft wieder zurückgewann, als es der Einwirkung von $^1/_2$%iger alkoholischer Oxalsäure in der Wärme ausgesetzt war. Danach könnte man allgemein sagen, daß Chlorophyllan, solange es nur nach Hoppe-Seylers Methode gereinigt war, d. h. aus Alkohol „umkristallisiert" war, in der Regel Phyllogen resp. Phäophytin repräsentiert, welches durch Phyllocyanin verunreinigt ist. Indes muß der Satz Einschränkungen erleiden, da es, wie oben aus der Tabelle zu ersehen ist, auch Phyllogene geben kann, welche Säuren gegenüber sich genau so verhalten wie Rohchlorophyllan. Endlich muß auch daran gedacht werden, daß die Phyllogene einer und derselben Pflanzenart, je nach der Vegetationsperiode der Pflanze, variieren können.

Optisches Verhalten des Phyllogens, Phäophytins und Chlorophyllans.

Die spektralanalytische Untersuchung der Chlorophyllderivate ist, wie die Geschichte der Chlorophyllforschung zeigt, von eminenter Bedeutung. Sie wurde freilich in früheren Zeiten[1]) wie auch neuerdings unterschätzt, aber diejenigen Forscher, die sich der Blutforschung oder Chlorophyllforschung widmen, kommen sehr bald zu der Überzeugung, daß die Spektralanalyse eines derjenigen physikalischen Hilfsmittel ist, welches sie nicht entbehren können.

Daß bei der Anwendung dieser Untersuchungsmethode oft schwer gesündigt wird, worauf H. Kayser in der Einleitung zu dem 4. Band seiner Spektroskopie gerechterweise hindeutet, muß ohne weiteres zugegeben werden. Ebenso hat Kayser vollständig recht, wenn er behauptet, daß die Konfusion in der Chlorophyllchemie durch den Umstand sehr verbreitet wird, daß von jedem Forscher, der an die Chlorophyllchemie getreten ist und das Gebiet „erschlossen" haben will, immer neue Namen für altbekannte Substanzen eingeführt werden. Indessen kann ich dem Satz des verdienten Forschers auf dem Gebiet der Spektralanalyse, daß infolge der Unsicherheit der Methode halbwegs Messungen nur eines und desselben Forschers verglichen werden können, nicht unbedingt beipflichten, da die Geschichte der Chlorophyllforschung gerade eine Entdeckung aufweisen kann, die das Entgegengesetzte beweist. Ich erinnere an die Entdeckung der Tatsache, daß ein Umwandlungsprodukt des Chlorophylls im tierischen Organismus, das von mir entdeckte Phylloerythrin, identisch mit dem Cholehämatin von Mac Munn ist.[1]) Ich habe das Phylloerythrin rein isolieren können und sein spektroskopisches Verhalten genau beschrieben, auch habe ich seine Absorptionsverhältnisse im Ultraviolett genau charakterisiert. Das Cholehämatin war mir damals unbekannt. Auf Grund dieser meiner Beschreibungen des optischen Verhaltens des Phylloerythrins, hat dann Gamgee, der Phylloerythrin niemals in den Händen hatte, welcher aber Mac Munns Arbeit im Gedächtnis hatte, brieflich die Überzeugung ausgesprochen, daß beide Substanzen identisch sind, und meine

[1]) Vgl. hierüber bei Tschirch l. c.

späteren durch Gamgee in dieser Art veranlaßten Untersuchungen haben dann auch diese vermutete Identität beider Substanzen sowie auch die Frage des Bilipurpurins aufgeklärt. Bezüglich der spektralanalytischen Methode, welcher ich mich bediene, mögen hier einige Einzelnheiten folgen.

Ich habe zwei Spektralaparate zur Verfügung, und zwar ein ganz einfaches Instrument, sog. Kensington Type von Hilger in London und ein meinen Wünschen entsprechend konstruirtes Polarisationsspektrometer von Fuess in Steglitz, welches in der Art konstruirt ist, daß die Polarisationsvorrichtungen mit Leichtigkeit entfernt werden können, wodurch ein äußerst genaues Spektrometer resultiert. Die Prismen sind in keinem Apparat fix angebracht, sondern können nach Belieben ausgewechselt werden. Ich bediene mich je nach Umständen zweier verschiedener Flintprismen, eines Bor-Silicatprismas mit sehr geringer Dispersion, und habe außerdem ein Cornusches Quarzprisma wie auch ein Fluoritprisma (von Fuess) zur Verfügung. Beide Instrumente dienen zur subjektiven Beobachtung. Die meisten Messungen werden mit Hilfe des einfachen Hilgerschen Instrumentes ausgeführt, welches aber dadurch einen hohen Präzisionsgrad erreicht, daß es mit einem Mikrometerokular versehen wird, dessen „thread" $^1/_{100}$ Zoll beträgt. Das Okular ist mit einer 4-Volt-Lampe versehen, welche es ermöglicht, die Fäden auch im stark gebrochenen Teil des Spektrums, sowie auch in der Nähe des Infrarot genau einzustellen. Die Kalibrierung der Prismen geschah von mir selbst. Es wurden hierzu die Linien Kα, Na, Tl, Li, Hα, Hβ, Hγ, sowie die sehr hellen Heliumlinien des schwächer gebrochenen Teiles des Spektrums angewandt.

Außer den obigen Apparaten besitzt mein Institut ein vorzügliches Quarzspektrograph von Hilger in London. Bei demselben wurden alle Momente berücksichtigt, welche nach den Forschungen der Spezialisten dieses Gebietes notwendig sind, um möglichst gute Definition der Spektren zu erreichen. Die Linsen sind nicht achromatisch, wie in manchen Apparaten, die aus kontinentalen Firmen stammen, sondern einfache Quarzlinsen, welche aus entsprechenden enantiomorphen Krystallen hergestellt wurden. Ein Vergleich meiner Spektrogramme mit solchen, die mit Hilfe von Quarz-Fluorit Achromaten erhalten

werden, belehrte mich, daß meine Auswahl gut getroffen ist.[1]) Die Linsen haben eine Brennweite von 35,7 engl. Zoll (für D). Sie sind nahezu plankonvex; die konvexe Seite derselben wird entsprechend den Entwickelungen von Cornu[2]) dem Prisma zugewandt. Bekanntlich ist die Fläche, auf welcher das ganze Spektrum scharf liegen würde, keine Ebene, sondern eine Zylinderfläche, die sich aber um so weniger (praktisch genommen) von der Ebene unterscheiden wird, je länger die Brennweite der Linsen ist und je kleiner die zu photographierende Spektralregion. Diesen Anforderungen entspricht unser Instrument in vollem Maße.

Die Plattenkassette ermöglicht die Aufnahme von 7 Spektrogrammen. Infolge des Chromatismus der Linsen muß die Platte stark zur Richtung der Lichtstrahlen geneigt sein. Für die Spektralregion von 486,1 $\mu\mu$ bis 334,1 $\mu\mu$, welche bei den gegenwärtigen Studien in Betracht kommen, beträgt der entsprechende Winkel 23,5°. Über die Art der Einstellung des Spektrographen brauche ich mich hier nicht zu äußern, ich verweise diesbezüglich auf das berühmte Kaysersche Buch und besonders auch auf die Hartleyschen Arbeiten.

Die zu untersuchenden Flüssigkeiten wurden in einem Absorptionsgefäß untergebracht, welches von Fuess in Steglitz nach meinen Angaben konstruiert wurde, und welches übrigens an das von Baly[3]) beschriebene erinnert. Es besitzt zwei Fluoritfenster und ermöglicht die Untersuchung von Flüssigkeitsschichten von 5 mm aufwärts bis 25 mm. Die Änderung der Schichtendicke geschieht durch Verstellung einer inneren Schraube, deren Gang sehr präzis ausgeführt ist.

Die Beleuchtung des Apparates geschah mit Hilfe einer 64 Kerzen Nernst-Lampe, mit vertikalem, geradem Glühfaden. Der Erwärmungskörper ist spiral um den Glühfaden gewunden. Bei den ersten Aufnahmen wurde dieser Umstand als sehr störend befunden. Die Windungen erzeugten auf den Spektrogrammen horizontale Schatten, die besonders bei der Beobachtung matter Bänder störend wirkten. Diesem Übelstand wurde

[1]) Vgl. Schumann, Photogr. Rundschau 1892, H. 11. — Deslandres, Ann. chim. et phys. 15, 5, 1888. — Kayser, Spektroskopie 1, 631.

[2]) Kayser, Spektroskopie 1, 630.

[3]) Spectroscopy. London 1905, 414.

jedoch leicht dadurch abgeholfen, daß die Erwärmungsspirale behutsam vollständig entfernt, und die Inbetriebsetzung der Lampe durch direkte Erwärmung des Glühfadens mit Hilfe eines Bunsenbrenners erzielt wurde. Die Expositionsdauer betrug 3 Minuten. Die Platten stammten von Wratten und Wainwright, Croydon, und haben sich vorzüglich bewährt. Für die Aufnahme der stark gebrochenen Spektralregionen wurden die „Improved-Drop-Shutter"-Platten angewandt.

In der vorliegenden Abhandlung müssen wir uns begnügen, nur den allgemeinen Charakter der Absorptionen im stärker gebrochenen Teil des Spektrums zu beschreiben und zur Orientierung die Quecksilberlinien, welche von einer Heraeusschen Quarzquecksilberlampe auf die Platten geworfen wurden, benutzen. Die genaue Ausmessung der Lage der Absorptionsbänder soll später mit anderen Messungen gegeben werden. Es sei hier nur erwähnt, daß wir uns zweier Methoden bedienten, nämlich der Hartleyschen bei Anwendung des Eisen-Lichtbogens und der gewöhnlichen, auf der Ausmessung mit Hilfe eines Komparators beruhenden.

Für die Aufnahme der wenigen gebrochenen Spektrumteile wurden die Quarzlinsen durch achromatische Glaslinsensysteme, ebenfalls von Hilger hergestellt, ersetzt. Die Platten stammten von Wratten & Wainwright, Marke „Wratten-Panchromatic". Die Ausmessung der Spektren geschah hier mit dem Komparator.

Die gewisse Unsicherheit der spektralanalytischen Angaben, welche sich auf Absorptionsspektren beziehen, haben ihren Grund hauptsächlich in der ungenügenden Schärfe der Begrenzung der meisten Bänder, ein Umstand, der bei der Anwendung des Komparators zur Ausmessung der Spektrogramme ebenfalls sehr ins Gewicht fällt. Es wäre sehr wünschenswert, wenn die Physiker diesem letzteren Problem ihre Aufmersamkeit schenken wollten. Ich stelle mir vor, daß es möglich sein muß, eine Vorrichtung zu konstruiren, welche auf photometrischem Wege diejenige Region der Platte festlegen könnte, bei welcher eine Differenziierung der Schwärzung der Platte eintritt. Meine eigenen Bemühungen in dieser Richtung, die ich in Gemeinschaft mit einer optischen Werkstatt unternommen habe, haben bis jetzt noch kein mich befriedigendes Resultat geliefert.

Die besagten Schwierigkeiten fallen im Prinzip fort, wenn man beim Vergleich verschiedener Substanzen sich der spektralphotometrischen Methoden bedient. Die früheren hierzu konstruierten Apparate konnten mich für die Zwecke der Chlorophyllforschung nicht befriedigen. Die erhaltenen Resultate schwankten so außerordentlich und waren von so vielen, schwer zu eliminierenden Einflüssen abhängig, daß ich von der Anwendung derselben Abstand nehmen mußte. In neuerer Zeit werden vielfach die Leistungen des König-Martensschen Apparates besprochen und von verschiedenen Seiten lobend hervorgehoben. Wie ich unten zeigen werde, haben wir verschiedene Phyllogene in dem erwähnten Apparate untersucht. Vorläufig stand uns nur die kleinere Beleuchtungsvorrichtung zur Verfügung und als Absorptionsgefäß nur die Schulzsche Zelle. Die bis jetzt erhaltenen Resultate sind nur zum Teil befriedigend. Der Grund daran liegt vor allem in dem Umstand, daß sämmtliche Chlorophyllderivate so stark das Licht absorbieren, daß nur sehr verdünnte Lösungen angewandt werden können, was natürlich auf die Genauigkeit der Resultate nachteilig wirkt. Außerdem kommen aber noch andere Umstände in Betracht, die zu analysieren ich vorläufig unterlasse. Wir haben das Absorptionsvermögen der Phyllogen- und Phäophytinlösungen für nur wenige Lichtarten untersuchen können, nämlich für die orange, gelbe, grüne und blaugrüne Quecksilberlinie und für Natriumlicht.

Wir gehen nun zur Besprechung der erhaltenen Resultate über. Zunächst sei auf die Resultate früherer Forscher, welche beim Studium sog. modifizierter Chlorophylle erhalten wurden, sowie auch auf das Absorptionsspektrum des Chlorophyllans hingewiesen. Die sog. modifizierten Chlorophylle zeigten im Gegensatz zu Chlorophyllauszügen, welche 4 Bänder enthalten — 5 Bänder. Das Chlorophyllanspektrum wurde besonders von Tschirch[1]) ausgiebig studiert; für eine „mittlere optische Konzentration" in ätherischer Lösung, wie sie Tschirch nennt, sind folgende Wellenlängen charakteristisch:

Band I: $\lambda - 680 - \lambda\, 640$
„ II: $\lambda - 620 - \lambda\, 590$

[1]) l. c.

Band III: λ — 570 — λ 560
„ IV: λ — 550 — λ 530
„ V: λ — 513 — λ 490

Die von uns nach der gewöhnlichen Methode für Chloroformlösungen des Phyllogens und Phäophytins aus Ahornblättern erhaltenen Resultate sind die folgenden.

Phäophytin: Konzentration der Lösung 1 ccm = 0,0003 g. Schichtendicke 10 mm.

	Prisma mit großer Dispersion	Prisma mit kleiner Dispersion
Band I:	λ 690 — 641	λ 690 — 641
„ II:	λ 617 — 598,5	λ 619 — 601
„ III:	λ 568.5 — 559,0	λ 568 — 559,5
„ IV:	λ 545.5 — 532,0	λ 546 — 530,5
„ V:	λ 515 — 496	λ 516 — 498

Konzentration 1 ccm = 0.00015 g.

Band I:	λ 688 — 648	λ 686 — 648
„ II:	λ 616 — 601	λ 614 — 602
„ III:	λ 568 — 560	λ 566 — 561
„ IV:	λ 545 — 537	λ 543 — 538
„ V:	λ 513 — 498	λ 512 — 498

In ätherischer Lösung wurden ganz analoge Wellenlängenwerte erhalten. Aus den zahlreichen Messungen, die ausgeführt wurden, nehmen wir nur diejenigen heraus, die bei Konzentrationen erhalten wurden, die offenbar den von Willstätter eingehaltenen entsprachen.

	Größere Dispersion	Kleinere Dispersion
Band I:	λ 683 — 647	λ 684 — 647
„ II:	λ 612 — 600	λ 614 — 600
„ III:	λ 563 — 556	λ 567 — 556
„ IV:	λ 539 — 531	λ 541 — 529
„ V:	λ 509 — 494	λ 513 — 493

Willstätter erhielt unter anderen folgende Wellenlängen:

Band I: λ 684 — 650
„ II: λ 619 — 599
„ III: λ 569 — 556
„ IV: λ 538 — 528
„ V: λ 511 — 490

Wie ersichtlich, sind die von dem Züricher Forscher erhaltenen Werte den unsrigen sehr nahestehend. Eine Differenz besteht jedoch in unseren Befunden, und zwar insofern, als es uns niemals gelang, einen so ausgeprägten Schatten am dritten, äußerst schwachen Bande, an der dem Violett zugekehrten Seite zu entdecken. Dagegen zeigt das V. Band bei entsprechender Konzentration der ätherischen Lösung zwei Dunkelheitsmaxima, von denen das dem Rot zugekehrte stärker ist. Außerdem besitzt, wie die Photogramme zeigen, das Phäophytin ähnlich wie Phyllogen eine Reihe von Bändern hinter der F-Linie, die weiter unten besprochen werden.

Das Phyllogen aus Ahornblättern, in denselben Konzentrationen untersucht, zeigt beim unmittelbaren Vergleich mit Phäophytinlösungen genau dasselbe Spektrum, und wir unterlassen es daher, für das Phyllogen aus Ahornblättern die erhaltenen Werte hier anzuführen. Die Übereinstimmung wird aber evident sein, wenn man die unten angeführten Werte für Phyllogene aus anderen Pflanzen betrachtet.

Phyllogen aus Akazienblättern. Konzentr. 1 ccm = 0,00033 g. Schichtendicke 10 ccm. Lösungsmittel Chloroform.

	Kleine Dispersion	Größere Dispersion
Band I	λ 690—640	λ 689—640
„ II	λ 623—596	λ 621—596
„ III	λ 570—562	λ 569—561
„ IV	λ 549—531	λ 547—531
„ V	λ 518—493	λ 516—495

Konzentration 1 ccm = 0,00025

Band I	λ 687—644	λ 687—643
„ II	λ 619—597	λ 617—597
„ III	λ 569—562	λ 567—561
„ IV	λ 545—532	λ 545—533
„ V	λ 517—496	λ 516—497

Konzentration 1 ccm = 0,0001 (kleine Dispersion)

Band I	λ 682—648
„ II	λ 612—600
„ III	λ 567—563
„ IV	λ 544—536
„ V	λ 514—501

Konzentr.: 1 ccm = 0,00005		Konzentr.: 1 ccm = 0,000025	
Band I	λ 680—652	Band I	λ 677—657
„ II	λ 609—602	„ II	kaum sichtbar
„ III	kaum sichtbar	„ III	„ „
„ IV	λ 543—538	„ IV	λ 542—538
„ V	λ 513—506	„ V	λ 512—506

Konzentr.: 1 ccm = 0,0000125	Konzentr.: 1 ccm = 0,0000062
Band I λ 671—658	Band I schwach sichtbar
„ II, III u. IV kaum sichtbar	Maximum der Dunkelheit
„ V 542—538	bei λ 667.

Ganz analoge Werte wurden auch bei der Untersuchung des Phyllogens aus Ficus-Repens-Blättern, sodann aus Gras und Brennesselblättern erhalten. Geringe Unterschiede wie die, welche beim Vergleich obiger Werte mit denen für Phyllogen aus Ahornblättern erhaltenen zutage treten, werden natürlich auch dort bemerkt, da ja die Phyllogene aus verschiedenen Pflanzen etwas voneinander abweichen.

Bezüglich der Bänder im stärker gebrochenen Teil des Spektrums verweise ich auf die nichtvergrößerten Reproduktionen der erhaltenen Photogramme, welche jedoch natürlich manche äußerst subtile Einzelheiten der Originale nicht wiedergeben können. Auf Tafel 1 sind die Spektren zweier Phyllogene und eines Phäophytins in der Spektralregion von etwa 486,1 $\mu\mu$ bis etwas über 334,1 $\mu\mu$ wiedergegeben. Platte I zeigt das Spektrum des Phyllogens aus Ahornblättern, Platte II des Ahornblätterphäophytins und Platte III des Akazienphyllogens. Die Lösungen wurden in Chloroform hergestellt, die Konzentration betrug bei der Aufnahme der Nummern 1, 2 und 3 in 1 ccm = 0,000012 g, und die Schichtendicke stieg von 5 mm auf 10 und endlich 15 mm. Den Nummern 4, 5, 6 entsprechen Chloroformlösungen, deren Konzentration 0,000024 g pro 1 ccm betrug, und die Schichtendicke stieg von 10 mm auf 12,5 und 15 mm. Eine auch nur oberflächliche Betrachtung dieser Photographien überzeugt bereits sofort, daß die Spektren in allen Fällen identisch sind. Zunächst bemerkt man ein Band, welches vor der Hg = 436 $\mu\mu$ Linie liegt, sodann das dunkelste Band der ganzen Serie vor der Hg = 405 $\mu\mu$ Linie, welcher ein Band hinter dieser Linie folgt. Dann kommt ein viertes

Band vor der Tripplette Hg = 366,3, 365,6, 360,0 und endlich eine Spur eines Bandes hinter dieser Liniengruppe außer der Endabsorption die noch durch besondere Aufnahme unter Anwendung eines Fluoritprismas aufzulösen ist.

Tafel 2 (Platte I und II) gibt Reproduktionen des Spektrums des Ahornblätter-Phyllogens in Chloroformlösung im weniger gebrochenen Teil. Platte I wurde für eine Lösung von der Konzentration 1 ccm = 0,00015 g und bei Anwendung der Schichtendicken: 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0 mm erhalten. Platte II repräsentiert die Absorptionen zweier Lösungen, deren Konzentrationen 0,000024 resp. 0,000048 entspricht, bei Anwendung der Schichtendicken von 5,10 mm resp, 10 und 15 mm. Aufnahme 10 auf Platte II zeigt den Effekt weißen Lichtes auf die Platte. Wie ersichtlich, zeigt die Platte Empfindlichkeitsminima im Grün und im Orange, die jedoch auf die Absorptionsspektra keinen merklichen Einfluß haben. Zum Vergleich endlich wurde auf jede Platte das Linienspektrum des Heliums geworfen.

Es zeigt sich also, daß Phyllogen nicht weniger als zehn Absorptionsbänder im Spektrum verursacht. Inwieweit noch Absorptionen im äußersten Ultraviolett und im Infrarot in Frage kommen, hoffen wir später entscheiden zu können.

Quantitative Absorptionsverhältnisse der Phyllogen-Äther-Lösungen.

Wie bereits erwähnt, haben wir auch einige Versuche über die quantitativen Absorptionsverhältnisse der verschiedenen Phyllogene in ätherischen Lösungen ausgeführt. Die erhaltenen Resultate sind nur als annähernd richtig zu betrachten, und zwar hauptsächlich aus dem Grunde, weil die uns vorläufig zur Disposition stehenden Vorrichtungen es nicht erlaubten, Fehlerquellen ganz auszuschließen, welche, wenn auch scheinbar noch so geringfügig, bei der außerordentlichen Empfindlichkeit des König-Martenschen Apparates schwer ins Gewicht fallen. Infolge der starken Absorptionen der Phyllogenlösungen mußten zudem äußerst verdünnte Lösungen in Anwendung kommen und bereits dieser Umstand muß auf die Genauigkeit der Resultate nachteilig wirken. Zur Berechnung der Extinktionskoeffizienten für orange, gelbe, grüne und blaue Strahlen konn-

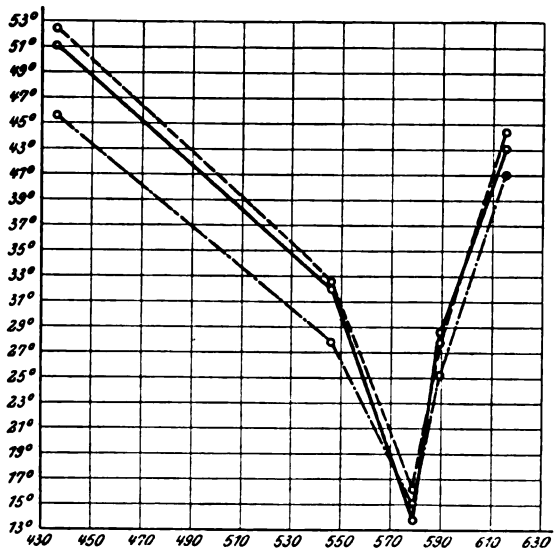


Fig. 1.

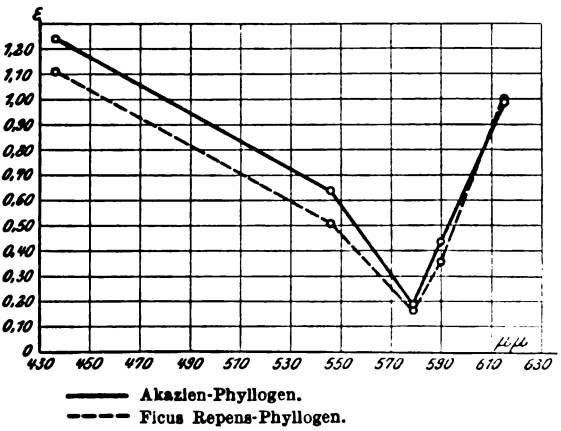


Fig. 2.

ten nur Lösungen angewandt werden, welche im Liter 0,0025 g Phyllogen enthielten. Bei anderen Konzentrationen waren die Winkel für die Mehrzahl der Wellenlängen größer als 90°, und wir müssen uns daher begnügen, für solche Lösungen nur die Differenzen $\alpha_1 - \alpha_2$ anzuführen. Diese Werte wurden auch be-

nutzt, um die Kurventafel (Fig. 1) zu zeichnen. Um Beobachtungsfehler möglichst auszuschließen, wurden die Ablesungen der Winkel immer von zwei Beobachtern besorgt, derartig, daß zwei Ablesungen für eine Wellenlänge von einem, die dritte Ablesung von dem zweiten geschah. Bei der folgenden Wellenlänge geschah dies umgekehrt. Der Vorgang wird durch das folgende Beispiel erläutert:

Phyllogen aus Ficus Repens, Konzentr. 1 ccm = 0,000025 g.
Lichtquellle: Grüne Linie der Quarzquecksilberlampe.

Schulzscher Körper rechts	40,4°	138,5	220,4	318,0	Beob. I
	40,6°	138,8	220,2	318,5	Beob. I
	40,7°	139,0	220,6	318,7	Beob. II
	Mittel 40,57	—138,77	220,40	—318,40	
	180,00	220,57	180,00	400,40	
	220,57	81,80	400,4	82,00	
	1. 81,80				
	2. 82,00				
	Mittel 81,9 = α_1				
Schulzscher Körper links	32,6	147,7	212,3	326,9	Beob. II
	32,5	147,3	212,2	327,0	Beob. II
	33,0	147,5	213,2	327,5	Beob. I
	Mittel 32,70	—147,50	212.57	—327,13	
	180,00	212,70	180.00	392.57	
	212,70	65,20	392,57	65.44	
	1. 65,20				
	2. 65,44				
	Mittel 65,32° = α_2				

Die in dieser Art erhaltenen Werte sind in folgenden Tabellen zusammengestellt:

Konzentr.: 1 ccm = 0,0001 g.

	Natrium-Licht			Gelbes Hg-Licht			Grünes Hg-Licht		
	α_1	α_2	α_1-α_3	α_1	α_2	α_1-α_2	α_1	α_2	α_1-α_2
Phyllogen aus Ficus Repens	97,08	52,30	44,78	93,80	64,00	29,80	108,09	48,65	59,44
Phyllogen a. Akazienblättern	95,72	53,73	41,99	92,25	64,83	27,42	105,47	50,30	55,17
Phyllogen a. Ahornblättern	98,12	50,75	47,37	95,63	62,11	33,52	109,27	48,20	61,07

Konzentr.: 1 ccm = 0,00005.

	Orange Hg-Strahlen			Na-Strahlen			Gelbe Hg-Strahlen			Grüne Hg-Strahlen			Grünblaue Hg-Strahlen		
	α_1	α_2	$\alpha_1-\alpha_2$	α_1	α_2	$\alpha_1-\alpha_2$	α_1	α_2	$\alpha_1-\alpha_2$	α_1	α_2	$\alpha_1-\alpha_2$	α_1	α_2	$\alpha_1-\alpha_2$
Phyllogen aus Fic. Rep. .	100,68	57,6	43,08	88,97	59,92	28,55	83,43	69,60	13,83	90,96	58,91	32,05	103,54	52.42	51,11
Phyllogen aus Akazienblättern	99,34	58,3	41,04	87,71	62,53	25,18	84,06	68,95	15,11	88,84	61,03	27,81	102,08	54,47	45,61
Phyllogen a. Ahornblättern	100,37	56,0	44,37	90,30	62,55	27,75	85,01	68,77	16,24	91,12	58,52	32,60	103,81	51,32	52,49

Konzentr.: 1 ccm = 0,000025.

	Orange Hg-Strahlen			Na-Strahlen			Gelbe Hg-Strahlen			Grüne Hg-Strahlen			Grünblaue Hg-Strahlen		
	α_1	α_2	ε	α_1	α_2	ε	α_1	α_2	ε	α_1	α_2	ε	α_1	α_2	ε
Phyllogen aus Fic. Rep. .	87,33	64,91	1,0017	80,98	70,06	0,3588	79,70	75,03	0,1677	81,90	65,32	0,5085	87,93	64,98	1,1110
Phyllogen aus Akazienblättern	87,26	64,82	0,9923	82,55	70,28	0,4379	79,81	74,61	0,1851	84,22	66,06	0,6421	89,08	66,51	1,2438

Die Werte der letzten Tabelle sind auf der Kurventafel (Fig. 2) graphisch verwertet, wobei die ε-Werte auf der Ordinatenachse die Wellenlängen, in $\mu\mu$ ausgedrückt, auf der Abszissenachse eingetragen wurden. Es fällt auf, daß bei der geringsten Konzentration die Absorptionen mit einer Ausnahme (im Orange) des Akazienphyllogens etwas stärker sind als des Ficus-Repens-Phyllogens, während bei stärkeren Konzentrationen das Umgekehrte konstatiert wurde, wie dies von der ersten Kurventafel veranschaulicht wird. Der Grund hiervon mag in einem experimentellen Fehler liegen, oder aber auch darin, daß Akazienphyllogen, wie oben ausgeführt, etwas Phyllocyanin beigemengt zu enthalten scheint. Jedenfalls zeigen jedoch die obigen Messungen, daß bei den untersuchten Phyllogenen die Absorptionsverhältnisse, wenigstens für die oben erwähnten Lichtwellen, durchaus analog sind, was auf Grund der spektroskopischen Messungen eben zu erwarten war. Wir hielten es für nicht der Mühe wert, diese colorimetrische Methode auf ein Chlorophyllderivat, wie Phyllogen oder Phäophytin, weiter auszudehnen, beabsichtigen dies jedoch bei vollkommen einheitlichen Chlorophyllderivaten zu tun.

Komplexe Metallsalze des Phyllogens.

Phyllogen besitzt die Eigenschaft, wie alle bis jetzt von Tschirch, Schunck, E. Schunck und mir und später von Willstätter und anderen Forschern des Chlorophylls untersuchten Derivate des Chlorophylls bzw. der Chlorophylle, welche noch nicht zu weit abgebaut sind, mit Metallsalzen in Verbindung zu treten, deren Stabilität jedoch von der Natur des Metalls und der Säure abhängt. Die Kupfersalze sind in der Regel die stabilsten.

Diese Eigenschaft steht wahrscheinlich mit dem Pyrrolkomplex (bzw. Pyrrolbildenden-Komplex) des Chlorophylls in Beziehung, denn es fällt auf, daß Hämopyrrolazoderivate ebenfalls zur Bildung von komplexen Metallsalzen geneigt sind, wie dies der eine von uns mit Goldman und Hetper[1]) gezeigt hat, und was demnächst noch näher auseinander gesetzt wird.

[1]) l. c.

Die betreffenden Verbindungen werden leicht erhalten, indem man die essigsaure Phyllogenlösung mit der betreffenden Metallsalzlösung vermischt und kurze Zeit erwärmt. Das Erwärmen ist allerdings nicht in allen Fällen notwendig. Die Reaktion ist sofort an der eintretenden Farbenänderung zu erkennen. Die ursprünglich olivbraune Farbe des Phyllogens wird unter dem Einfluß der Metallsalze grün bzw. blaugrün, und je nach der Natur des Metalles wird eine fluoreszierende oder nicht fluoreszierende Lösung erhalten. Das Spektrum unterliegt dabei sehr wesentlichen Modifikationen.

Besonders interessant sind die Verbindungen, welche aus einigen Chlorophyllderivaten entstehen, wenn man ihre alkoholischen Lösungen mit Zinkhydrat (frisch gefällt) mischt und in die warme Lösung einen Kohlensäurestrom einleitet. Die Reaktion wurde von E. Schunck beim Phyllocyanin entdeckt; wir fanden, daß Phyllogen ganz analog reagiert ebenso wie Phylloxanthin, worüber später berichtet werden wird.

Die erwähnte Verbindung des Phyllogens (hierzu wurde Ahornblätter-Phyllogen benutzt) wird erhalten, indem die alkoholische Lösung desselben zunächst bei Siedehitze mit frisch gefälltem, gut ausgewaschenem $Zn(OH)_2$ versetzt wird und sodann eine Zeitlang kochend mit Kohlensäure behandelt wird. Nach einiger Zeit wird das Gefäß vom Wasserbade entfernt und, ohne den Kohlensäurestrom zu unterbrechen, erkalten gelassen. Sodann wird wiederum auf dem Wasserbade erwärmt, im Kohlensäurestrom erkalten gelassen und diese Prozedur noch einmal wiederholt. Die Länge der Kohlensäureeinwirkung hängt von der Menge des in Arbeit genommenen Phyllogens ab und muß nach dieser geregelt werden. Die Lösung wird filtriert, die größte Menge abdestilliert, Wasser zugefügt und das in grünen Flocken abgeschiedene Salz mit Äther extrahiert. Der größte Teil der Flocken löst sich dabei leicht mit prächtig grüner Farbe. Die Lösung zeigt starke rote Fluorescenz. Nach dem Eindampfen des Äthers hinterbleibt eine dunkel-grünblaue Masse, die auch nach monatelangem Verweilen im Exsiccator im Vakuum über Schwefelsäure nicht spröde wird, was natürlich die Möglichkeit nicht ausschließt, daß Phyllogene anderer Pflanzen ein gefälligeres Produkt liefern werden. Das bis zur Gewichtssubstanz getrocknete Präparat wurde in Äther gelöst

und bei Anwendung einer Schichtendicke von 10 mm bei verschiedenen Konzentrationen spektroskopisch untersucht.

	Konzentr. 1 ccm = 0,005	Konzentr. 1 ccm = 0,00033
Band I u. II	λ 687—590	λ 682—592
„ III	λ 582—554	λ 578—555
„ IV	λ 539—514	λ 536—514

	Konzentr. 1 ccm = 0,0002	Konzentr. 1 ccm = 0,0001
Band I	λ 672—628	λ 666—641
„ II	λ 614—594	λ 611—602
„ III	λ 572—554	λ 569—557
„ IV	λ 531—513	λ 526—515

	Konzentr. 1 ccm = 0,00005.	Konzentr. 1 ccm = 0,000025
Band I	λ 662—644	Band I 659—650
„ II	λ 609—604	Absorptionsmaximum 655.
„ III	λ 571—558	
„ IV	kaum sichtbar	

Mit Zinkazetat und Kupferazetat reagiert Phyllogen in essigsaurer Lösung leicht. Die Reaktionsfähigkeit mit ersterem Salze bildet übrigens kein unterscheidendes Merkmal von Phylloxanthin. Es hat sich nämlich entgegen der Angabe von Schunck gezeigt, daß Phylloxanthin, wenn auch langsam, mit Zinkazetat reagiert und dabei eine Verbindung liefert, welche durch Mineralsäure leicht zersetzt wird, unter Regenerierung des Phylloxanthins.

Die Zink und Kupferverbindungen des Phyllogens unterscheiden sich auffallend in bezug auf Fluoreszenz. Während erstere in ätherischer Lösung sehr schön fluoresziert, zeigt das Kupfersalz keine Fluoreszenz. Die Darstellung dieser Verbindung ist ganz einfach; die essigsaure Lösung des Phyllogens wird mit dem Azetat schwach erwärmt und sodann mit Wasser stark verdünnt. Durch Äther wird dann die komplexe Verbindung entzogen und eventuell durch Verdampfen des Lösungsmittels im festen Zustande gewonnen. In spektroskopischer Beziehung unterscheiden sich diese Verbindungen sehr auffallend von der oben beschriebenen Zink-Kohlensäureverbindung. Das erste charakteristische Band im Rot unterleidet nämlich bei weitgehender Verdünnung eine Teilung in zwei Bänder. Eine konzentrirte ätherische Lösung der Zinkazetat-Verbindung des Akazienblätter-Phyllogens gab folgende Wellenlängenwerte:

Band I λ 677—622 Band III λ 570—555
„ II λ 613—597 „ IV λ 530—516

Die obige Lösung gab nach dem Verdünnen mit dem gleichen Volum Äther:

Band I λ 672—629 Band III λ 568—556
„ II λ 611—601 „ IV λ 528—519

Beim Verdünnen mit dem dreifachen Volum entsteht eine Lösung mit folgenden Bändern:

Band I λ 666—635 Band III λ 565—557
„ II λ 610—603 „ IV kaum sichtbar.

Verdünnung mit dem siebenfachen Äthervolum erzeugte eine Lösung, in welchem die Bänder II, III, IV kaum sichtbar und daher schwer zu messen sind, während das erstere Band geteilt wird. Die erscheinenden Bänder sind durch folgende Wellenlängen charakterisiert:

Band Ia λ 662—651, Band Ib λ 646—634.

Ersteres ist intensiver als das zweite. Verdünnung mit dem fünfzehnfachen Äthervolum gab endlich eine Lösung, in welcher Band I zwar noch meßbar ist, aber sehr matt erscheint. Die Lage der beiden Bänder entspricht jetzt:

Band Ia λ 660—654 Band Ib λ 644—634.

Die Kupferverbindung hat ein analoges Spektrum, nur sind die Bänder im Vergleich mit denjenigen der Zinkverbindung etwas nach dem blauen Ende des Spektrums hin verschoben:

Band I λ 664—613 Band III λ 559—541
„ II λ 605—595 „ IV λ 520—496

Verdünnung 1:1

Band I λ 663—618 Band III λ 556—543
„ II λ 603—596 „ IV λ 515—498

Verdünnung 1:3

Band Ia λ 655—641 Band III u. IV sind sehr
„ Ib λ 633—622 matt und schwer zu messen.
„ II λ 602—596

Verdünnung 1:7

Band Ia λ 654—644
„ Ib λ 630—623

die übrigen Bänder sind nahezu verschwunden.

Endlich sei erwähnt, daß das Phäophytin und das Chlorophyllan sich ganz analog verhalten, es wäre daher überflüssig die verschiedenen Messungen der entsprechenden Präparate hier im Detail zu beschreiben.

Vergleich des Chlorophyllans mit Phylloxanthin.

E. Schunck hatte beiläufig die Vermutung ausgesprochen, daß Chlorophyllan und Hypochlorin vielleicht mit dem Phylloxanthin identisch seien. In der Tat läßt sich eine gewisse Ähnlichkeit beider Produkte bemerken, wenn man das Chlorophyllan mit nicht genügend gereinigtem Phylloxanthin vergleicht. Eine nähere Prüfung dieser Substanzen zeigt jedoch, daß sie grundverschieden sind. Obwohl wir die Absicht haben, dem Phylloxanthin erst später eine ausführliche Publikation zu widmen, so sei hier um die oben berührte Frage endgültig zu erledigen auf die markantesten Unterschiede, welche zwischen beiden Substanzen bestehen, hingewiesen.

Zunächst ist hervorzuheben, daß Chlorophyllan in der Regel eine Substanz darstellt, welche wachsartige Konsistenz besitzt, während Phylloxanthin zwar bis jetzt noch nicht kristallisiert erhalten wurde, aber doch in Form eines blauschwarzen Produktes, welches sich leicht pulverisieren läßt. Der Stickstoffgehalt des Phylloxanthins ist bedeutend höher als der des Chlorophyllans.

Während die Lösungen des Chlorophyllans olivbraun gefärbt sind, sind die des Phylloxanthins, in dickeren Schichten beobachtet, mehr rotbraun. Erstere zeigen im weniger gebrochenen Teil des Spektrums fünf Bänder, letztere zwar auch fünf aber ihre Lage ist eine ganz andere. Man vergleiche die Reproduktionen des Spektrums des Phyllogens auf Tafel 2, welches gleichzeitig das Spektrum des Chlorophyllans illustriert mit den Reproduktionen des Phylloxanthinspektrums, welches unserer Arbeit im Bll. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1908, Heft 4 beigefügt ist. Die letzteren Reproduktionen zeigen auch, daß von dem sog. zweiten Tswettschen Band keine Spur vorhanden ist, wie dies der eine von uns an dieser Stelle[1]) bereits hervorhob. Hingegen tritt ein Band ungefähr auf der

[1]) 5, 344, 1907; 7, 282, 1907.

He_{VI}-Linie auf, welches wie gern hervorgehoben werden mag, zuerst von Tswett[1]) beobachtet wurde. Das vierte Band des Phylloxanthins zeigt außerdem, wie bereits betont[2]), übereinstimmend mit Tswetts Beobachtung zwei Dunkelheitsmaxima. Ebenso sind die Unterschiede in den Absorptionsverhältnissen beider Produkte im stärker gebrochenen Spektrumteil bedeutend. Chlorophyllan zeigt dort genau wie Phyllogen fünf Bänder, während Phylloxanthin nur drei zeigt, von welcher die zwei weniger gebrochenen bereits von C. A. Schunck[3]) beobachtet wurden.

Die Fähigkeit, komplexe Salze mit Salzen schwerer Metalle zu bilden, besitzen beide Produkte in gleichem Maße. Besonders hervorgehoben muß werden, daß Phylloxanthin auch mit Zinkazetat eine komplexe Verbindung liefert. Dieselbe verursacht in ätherischer Lösung untersucht zwei Bänder im stärker gebrochenen Spektrumteil (vgl. Tafel 3, I u. II).

Schlußwort.

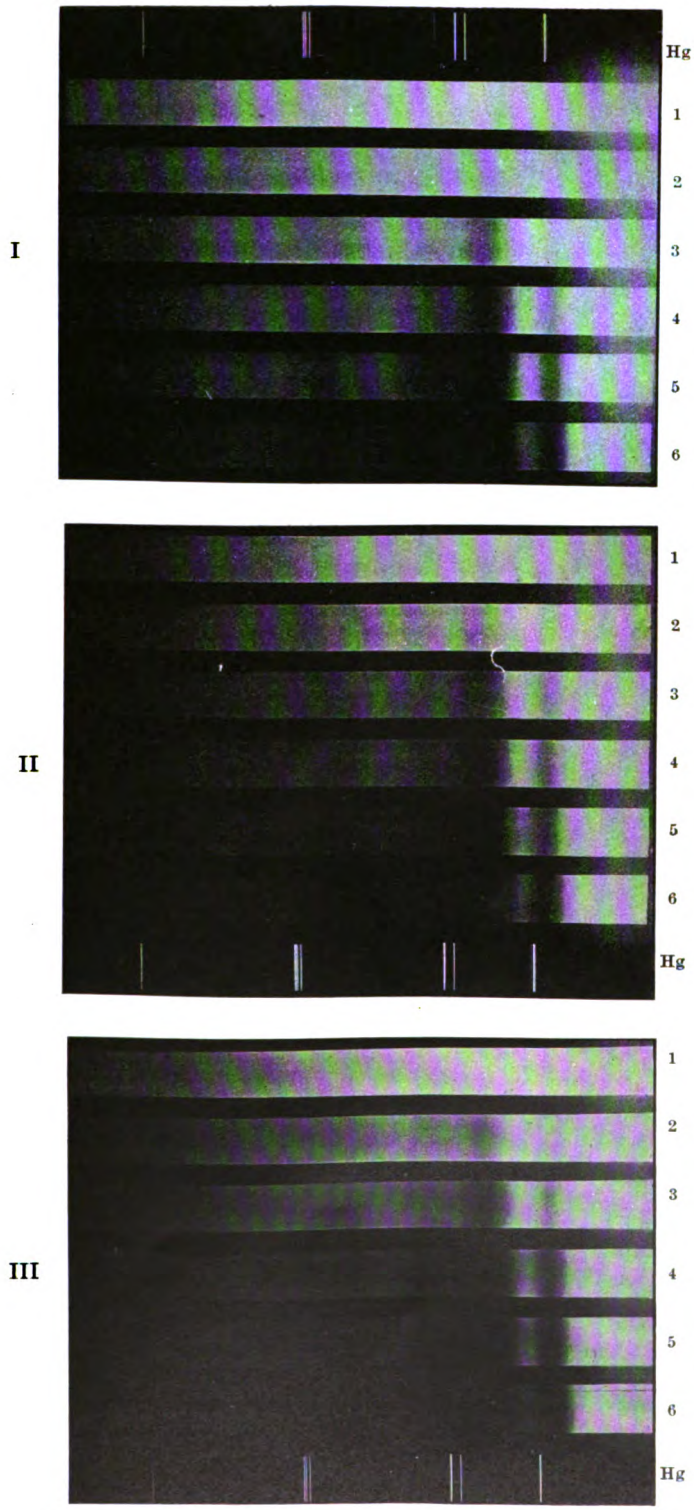
Die vorliegende Arbeit liefert, wie wir glauben, nicht abzuweisende Gründe für die Behauptung, daß Chlorophyll, Phäophytin und Phyllogen identische Substanzen sind. Die beiden letzterwähnten Körper, welche aus dem Chlorophyll durch Säurewirkung bei niedriger Temperatur erhalten werden, enthalten in der Regel kein Phyllocyanin, bzw. keine Abbauprodukte der Chlorophylle, welche den ätherischen Lösungen durch 15 % Salzsäure entzogen werden. Es gibt jedoch Phäophytine, bzw. Phyllogene, wie dasjenige der Akazienblätter, welche geringe Mengen solcher stärker basischen Produkte enthalten; es ist aber auch nicht ausgeschlossen, daß eine Säure von der genannten Konzentration auf die Phäophytine bzw. Phyllogene derartige Pflanzen bereits zersetzend wirkt und zur Bildung des Phyllocyanins führt. Chlorophyllan wird bei höherer Temperatur erhalten und kann demnach bereits infolge der energischen Wirkung der Pflanzensäure Zersetzungsprodukte enthalten. Durch die Entdeckung solcher Phyllogene, welche 15 % Säure

[1]) Diese Zeitschrift 5, 6, 1907.
[2]) Marchlewski, Diese Zeitschrift 7, 282, 1907.
[3]) Proc. Roy. Society 63, 389, 1898.

gegenüber sich analog verhalten wie Chlorophyllan, wird der prinzipielle Unterschied zwischen beiden Körperreihen beseitigt, um so mehr, als es gelang ein genuines Chlorophyllan durch entsprechende Reinigung von dem basischen Bestandteil zu befreien. In der Regel wird aber Phyllogen einheitlicher sein als Chlorophyllan. Da jedoch dem Phyllogen ebensowenig wie dem Phäophytin absolute Einheitlichkeit zugesprochen werden kann, so halte ich es für durchaus verfehlt, für die aus Chlorophyll bei gelinder Säurewirkung entstehenden Produkte neue Namen einzuführen, da hierdurch, wie Kayser sehr richtig bemerkt, unnötige Konfusion gefördert wird. Auf der Bildfläche der Chlorophyllforschung tauchten die besprochenen Substanzen in folgender chronologischer Reihenfolge auf: Chlorophyllan, Phyllogen und Phäophytin, und ich glaube, nur gerecht zu handeln, indem ich vorschlage, die beiden letzterwähnten Namen fallen zu lassen und nur den von Hoppe-Seyler ursprünglich vorgeschlagenen Namen „Chlorophyllan" beizubehalten. Für die einheitlichen Säureumwandlungsprodukte der beiden verbreitesten Chlorophylle könnten dann entweder die von Tswett bereits vorgeschlagenen Bezeichnungen Chlorophyllan α und Chlorophyllan β akzeptiert werden, oder, falls man sich entschließt, das Phytolfreie Chlorophyll-Allochlorophyll[1]) zu bezeichnen, die Namen Chlorophyllan und Allochlorophyllan benutzt werden.

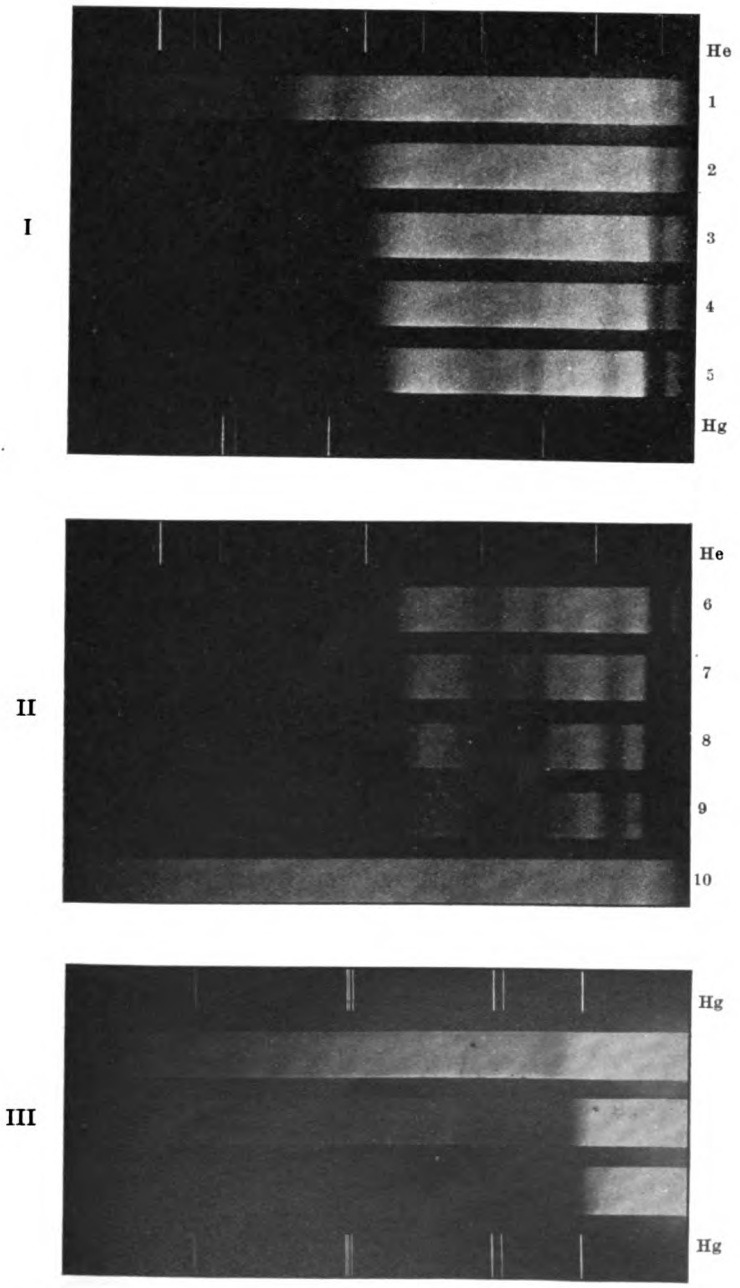
Endlich mag noch darauf speziell hingewiesen werden, daß auf Grund der vorliegenden Untersuchung die Lezithinkonzeption des Chlorophyllans endgültig fallen gelassen werden muß.

[1]) Siehe meine zit. Monographie.



I Ahornphyllogen. II Ahornphäophytin. III Akazienphyllogen.

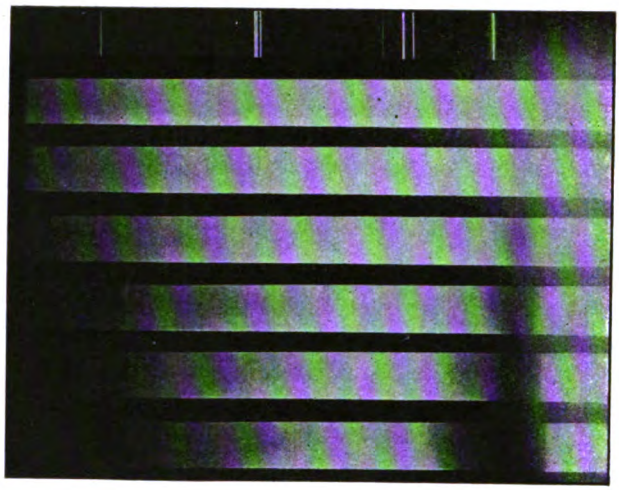
Tafel II.



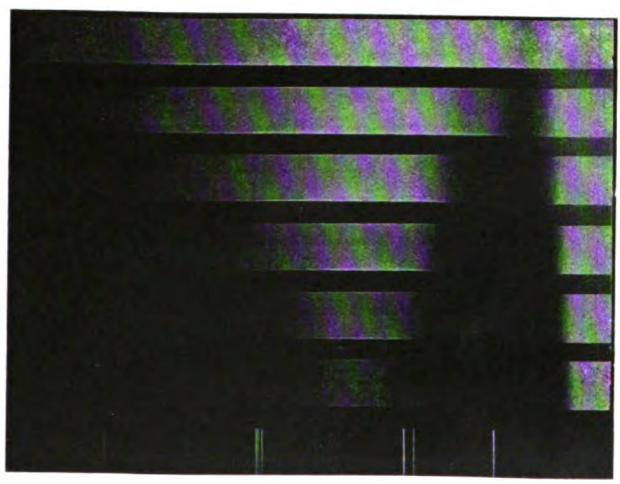
I u. II Ahornphyllogen in Chloroform. **III** Ahornphyllogen + $Zu(OH)_2$ + CO_2.

Tafel III.

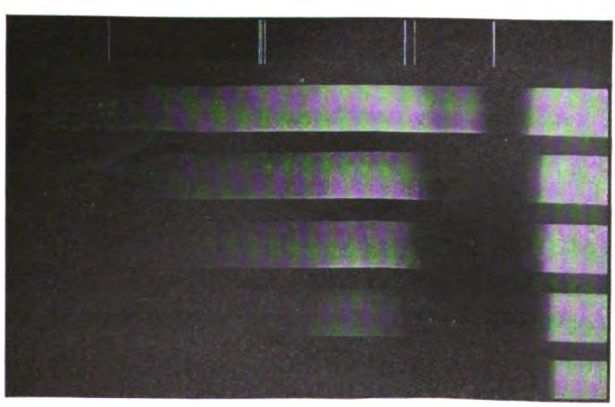
I



II



III



I u. II Phylloxanthin-Zinkazetat. III Phylloxanthin in Chloroform.

Biochemische Zeitschrift, Band X.
Marchlewski, Chlorophyllgruppe.

Beiträge zur Kenntnis des Knochenmarkes.

Von

Dr. med. et phil. Joseph Nerking.

(Aus der biochemischen Abteilung des Institutes für experimentelle Therapie zu Düsseldorf; Direktor: Professor Dr. H. Wendelstadt.)

(Eingegangen am 30. März 1908.)

Bei der Wichtigkeit des Knochenmarkes als blutbildendes Organ muß es auffallend erscheinen, daß verhältnismäßig wenig Forscher sich mit der genauen Ermittlung der chemischen Zusammensetzung des gesamten Knochenmarkes beschäftigt haben. Gorup-Besanez schreibt in seinem Lehrbuch der physiologischen Chemie: „Das Fett der Knochen ist ebensowenig wie das Knochenmark näher studiert. Das Knochenmark besteht vorwiegend ebenfalls aus Fett (an 96% nach einer Analyse von Berzelius), enthält aber außerdem Bindegewebe, in welchem das Fett eingeschlossen ist, und Gefäße. Wasser zieht aus dem Knochenmark Materien aus, welche mit denjenigen übereinstimmen, die kaltes Wasser aus Ochsenfleisch aufnimmt (Berzelius). Diese Angaben beziehen sich zunächst auf das blaßgelbe ziemlich konsistente Mark der Röhrenknochen; die die Zellenräume der spongiösen Knochen ausfüllende Masse ist weich, halbflüssig und meist von rötlicher oder völlig roter Farbe. Diese Substanz enthält Albumin und neben den nicht näher charakterisierten extraktartigen Materien eine freie organische Säure (Berzelius); ob diese Säure wirklich, wie Berzelius annahm, Milchsäure ist, wäre erst zu ermitteln, doch ist es nicht unwahrscheinlich."

Liebermann sagt in seiner Chemie des Menschen über das Knochenmark: „Die Markhöhle der Knochen, sowie die Hohlräume der spongiösen Epiphysen enthalten in Bindgewebe

eingeschlossenes, ziemlich flüssiges, an Ölsäure reiches Fett (genauer ist das Knochenmark noch nicht untersucht), ferner Albumin, Hypoxanthin, Cholesterin und Extraktivstoffe. Von hoher Bedeutung ist der große Gehalt an Eisen. Nasse (Malys Jahresbericht für Tierchemie 1877) hat eisenhaltige Körner aus Eisen und organischer Materie bestehend gefunden und gibt an, das Blutrot des Knochenmarkes enthalte mehr Eisen als dem colorimetrisch bestimmten Hämoglobin entspräche. Neumeister erwähnt in seinem Lehrbuch der physiologischen Chemie, daß das Knochenmark sämtliche Bestandteile der roten und weißen Blutkörperchen, namentlich Globuline und Nucleoalbumine enthalte, ferner Milchsäure und Hypoxanthin; außerdem erwähnt auch er dann im roten Knochenmark eigentümliche eisenhaltige Verbindungen, die wahrscheinlich Nucleoalbumine und Eisenalbuminate sind und zur Bildung und Zersetzung des Hämoglobins in Beziehung stehen dürften. Die Zusammensetzung des aus dem Rindermark gewonnenen Fettsäuregemisches gibt Neumeister nach Mohr als bestehend aus 63% Ölsäure, 22% Palmitinsäure und 10% Stearinsäure an. Hammarsten endlich schreibt in der neusten Auflage seines Lehrbuches der physiologischen Chemie, das gelbe Knochenmark enthalte überwiegend aus Olein, Palmitin und Stearin bestehendes Fett; im roten Knochenmark findet man Eiweißstoffe, bestehend aus einem bei 47—50° C gerinnenden Globulin und einem Nucleoproteid mit 1,6% Phosphor nebst Spuren von Albumin und außerdem Extraktivstoffe, wie Milchsäure, Hypoxanthin und Cholesterin, meist aber Stoffe unbekannter Art.

Zink hat die Fette verschiedener Knochenmarkssorten untersucht, die Dichte, Schmelz- und Erstarrungspunkte der Fette und der daraus abgeschiedenen Säuren, die Jodzahlen, Verseifungszahlen, Säurezahlen, Reichert-Meißl- und Acetylzahlen ermittelt und festgestellt, daß die Knochenmarksfette sich von dem übrigen Körperfett desselben Tieres durch eine beträchtlich höhere Acetylzahl unterscheiden. Eylert wollte in dem Knochenmark von Ochsen eine neue bei 72,5° C schmelzende Säure von der Formel $C_{21}H_{42}O_{21}$ gefunden haben und hat sie Marksäure genannt. Mohr wies nach, daß diese Marksäure nichts anderes war als Stearinsäure.

Über die Eiweißstoffe des roten Knochenmarks liegen die

ersten Arbeiten vor von Forrest und Halliburton. Über die Extraktivstoffe des Knochenmarks berichten E. Salkowski, dann Heymann und später noch Salomon.

Bang konnte bei seinen Untersuchungen über das Vorkommen von Nucleoproteiden in lymphatischen Organen in Knochenmark kein Nucleohiston nachweisen. Wohlgemuth wies in einer Anzahl menschlicher Knochenmarke Albumosen, und zwar vorzugsweise Deuteroalbumosen nach und beschrieb außerdem das Vorkommen eines Nucleoproteids im wässerigen Extrakt des Knochemarks, aus dem er es durch Ansäuren mit Essigsäure gewann; der Körper gibt schwach Orcinsalzsäurereaktion und enthält 1,78% Phosphor. Orville Harry Brown und Charles Claude Guthrie fanden im Mark der Röhrenknochen von Hunden und Ochsen eine Substanz, die, mit Kochsalzlösung gemischt, Hunden intravenös injiziert, den Blutdruck erniedrigt; die Ursache der Blutdruckerniedrigung, die nach der Injektion eintritt, ohne die Herztätigkeit zu verändern, ist wahrscheinlich eine Gefäßerweiterung; diese Substanz wirkt anregend auf die Respiration und wird durch Kochen nicht zerstört. Später haben dann Orville Harry Brown und Don R. Joseph mehrere Substanzen im Knochenmark beschrieben, von denen die einen den Blutdruck erhöhen, die anderen erniedrigen; beide Arten werden erhalten durch Extraktion von Knochenmark bei 45° C mit 0,9% Kochsalzlösung; die blutdrucksteigernde Substanz ist unlöslich in Glycerin, nur teilweise löslich in Alkohol, bzw. wird von diesen Agenzien teilweise zerstört; die blutdruckherabsetzende Substanz dagegen ist löslich in Glycerin und Alkohol.

Schumm wies nach, daß leukämisches Knochenmark der Autolyse fähig ist und dabei besonders Leucin und Tryptophan auftreten. Paul Th. Müller wies nach, daß das Knochenmarksextrakt bei Tieren, die wochenlang mit Bakterien verschiedenster Art vorbehandelt waren, eine deutliche Steigerung des Gesamteiweißgehaltes zeigt, und zwar sind Albumine und Globuline nur wenig, außerordentlich aber das Fibrinogen vermehrt, und zwar besonders bei Typhus-, Streptocokken- und namentlich bei Eiterstaphylocokkentieren; diese Eiweißvermehrung erfolgt durch die bei jeder Infektion zu beobachtende Umwandlung von Fettmark in rotes lymphoides Mark, d. h.

durch Übergang fettreicher in eiweißreiche Zellen. Aus dem Blute des Knochenmarkes stammt das neugebildete Fibrinogen nicht, ebensowenig entsteht es durch einfache Zunahme der fibrinogenhaltigen Protoplasmaelemente, da in diesem Falle eine Steigerung des Gesamteiweißes proportional gehen müßte. Die Fibrinogenbildung erfolgt vielmehr im Knochenmarke selbst und wird durch die Immunisierung gesteigert. Über das Vorkommen und die Menge des Lecithins im Knochenmark liegen dann noch zwei neuere Arbeiten vor von Glikin und Otolski.

Als Gesamtzusammensetzung des Knochenmarkes gibt König (Nahrungs- und Genußmittel) an:

	Wasser	Stickstoffsubstanz	Fett	Asche
1.	3,49%	1,30%	92,53%	2,78%
2.	5,82%	5,04%	87,74%	1,74%

König unterscheidet nicht zwischen rotem und gelbem Knochenmark, so daß man annehmen muß, es handele sich bei dieser Analyse um eine Mischung.

Zu meinen Untersuchungen habe ich das Mark von Rinderknochen verwandt, das vom Metzger bezogen wurde; die Knochen wurden mir nicht aufgeschlagen geliefert; sie wurden unter Umgehung von eisernen Instrumenten geöffnet, das Mark mit Platin- oder Nickelspatel herausgenommen; rotes und gelbes Knochenmark wurden, soweit dies möglich, getrennt. Ferner trug ich Sorge, die feinen Knochenbälkchen der Epiphysen so weit wie irgend möglich zu entfernen. Das Mark wurde sodann im Porzellanmörser längere Zeit tüchtig durchgeknetet und zerrieben, um eine möglichst homogene Masse zu erhalten, die zu weiterer Verarbeitung und Untersuchung geeignet erschien.

Das gelbe Knochenmark war halbflüssig, das sog. rote Mark von festerer, mehr salbenartiger Konsistenz und nur schwach rötlich gefärbt.

I. Bestimmung des H_2O-Gehaltes.

Der Wassergehalt des Markes wurde in der Weise bestimmt, daß eine gewogene Menge des Marks entweder für sich oder nach vorherigem Schmelzen aufgesaugt von reinem gewaschenem und geglühtem Seesand zuerst 6 Stunden bei 60 bis

75° C, dann 2 h bei 100° C getrocknet wurde; danach wurde gewogen und weiter bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ich fand so

für rotes Mark: 1. 3,23%
2. 4,11%
3. 8,17%

für gelbes Mark: 1. 3,46%
2. 3,81%

Fränkel gibt für den Wassergehalt des Markes an:
für rotes Mark: 67,42%

ohne Angabe, von wem die Analyse stammt und von welchem Tiere das Mark herrührt; für gelbes Mark wird keine Zahl angegeben. Im Mittel würde sich bei meinen Analysen ergeben

für rotes Mark: 5,17%
für gelbes Mark: 3,63%

Zahlen, die sich denen von König gefundenen sehr nähern; offenbar schwankt der Wassergehalt in ziemlichen Grenzen, doch scheint mir der Wert Fränkels entschieden zu hoch.

II. Aschenbestimmung.

Dieselbe wurde entweder so vorgenommen, daß etwa 10 g Mark direkt vorsichtig ohne oder mit Zusatz von Soda und Salpeter in gewogener Menge im Platintiegel verascht wurden; ein anderes Mal wurde das Mark mit Äther erschöpft, der ätherische Rückstand verascht. Es ergaben:

1. 10,00 g Mark direkt verascht:
   0,011 g = 0,11%
2. 10,00 g Mark mit Soda und Salpeter verascht:
   0,012 g = 0,12%
3. 10,00 g Mark direkt verascht:
   0,0115 g = 0,115%
4. 125 g Mark mit Äther erschöpft, nicht ätherlöslich waren: 1,623 g, davon Asche:
   0,2248 g = 0,169%.

   Das Mittel aus vier Analysen:
   0,128%.

In Königs Analysen finden wir als Asche 1,74%; Fränkel gibt als Salzbestandteile an: 2,34% lösliche, 0,66% unlösliche Salze, insgesamt 3%. Meine beträchtlich niedrigeren Zahlen für die Aschenwerte lassen sich wohl daraus erklären, daß ich bemüht war, sorgfältig die kleinen Knochenbälkchen der Epiphysen, die auch bei großer Aufmerksamkeit leicht mit in den Knochenmarksbrei geraten, auszulesen und zu entfernen.

III. Bestimmung des wasserlöslichen Anteils im Knochenmark.

I. Versuch. 300 g rotes im Mörser gut durchmischtes Knochenmark wurden mit etwa 600 ccm kaltem destilliertem Wasser 24 Stunden in der Kälte ausgezogen, dann filtriert, das Filtrat in einer Nickelschale verdunstet, getrocknet und gewogen; es hinterblieben 2,697 g. Das mit kaltem Wasser erschöpfte Mark wurde nun mit heißem destilliertem Wasser 6 Stunden behandelt, filtriert, Filtrat wiederum verdunstet getrocknet und gewogen; diesmal wog der Rückstand 1,5 g; insgesamt waren also durch das Wasser aus dem Mark ausgezogen: 4,197 g = 1,399%.

II. Versuch. 50 g rotes Knochenmark mit 200 ccm kaltem destilliertem Wasser ausgezogen ergaben 0,442 g; danach 6 Stunden mit heißem Wasser extrahiert, der Extrakt wog: 0,081 g, insgesamt also:

$$0{,}523\ \text{g} = 1{,}046\%.$$

50 g gelbes Knochenmark ebenso behandelt ergaben kalt: 0,353 g, heiß 0,035 g, insgesamt 0,388 g = 0,776%.

100 g gelbes Knochenmark mit Wasser, erst kalt, dann heiß behandelt, ergaben insgesamt 0,9 g = 0,9%.

III. Versuch. 500 g rotes Knochenmark, kalt mit Wasser ausgezogen, lieferten 3,820 g Extrakt, bei der darauffolgenden heißen Behandlung 2,150 g Extrakt, insgesamt also: 5,97 g = 1,194%.

Für das rote Knochenmark ergibt sich demnach als Mittel: 1,213% Gesamtwasserextrakt.

Für das gelbe Mark: 0,838% Gesamtwasserextrakt.

Die weitere Untersuchung des Wasserextraktes wurde nun folgendermaßen ausgeführt:

I. 4,197 g Auszug von 300 g Mark wurden mit warmem absolutem Alkohol ausgezogen; es gingen in Lösung 0,3 g; diese wurden nun nach Salomons Angabe weiter behandelt. Der Rückstand wurde also in Wasser wieder gelöst, filtriert, das Filtrat mit Silbernitrat versetzt, wodurch eine bleibende, in Ammoniak unlösliche Trübung, nach einiger Zeit ein Niederschlag entstand. Dieser wurde abfiltriert, gewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom ausgeschiedenen Schwefelsilber abfiltriert, das Filtrat zur Trockne verdampft, mit schwefliger Säure (1:30) erwärmt und filtriert. Der Rückstand getrocknet, zeigt spärliche Wetzsteinformen unter dem Mikroskop und gibt schwache Murexidprobe, enthält also Harnsäure. Das Filtrat mit NH_3 versetzt mit Silbernitrat gefällt, filtriert; der Niederschlag wird in heißer Salpetersäure von 1,1 spezifischem Gewicht gelöst und scheidet beim Erkalten Krystalle von salpetersaurem Hypoxanthinsilber aus; die Krystalle wogen: 0,0450 g = 0,020 g Hypoxanthin im Extrakt von 300 g Mark = 0,0066%.

Das Filtrat vom salpetersauren Hypoxanthinsilberniederschlag wurde mit schwefliger Säure übersättigt, filtriert, das Filtrat mit Äther geschüttelt, der Äther abdestilliert, der Rückstand gelöst in Wasser, zu Sirup eingedampft, wieder gelöst und mit reinem kohlensaurem Zink gekocht, vom überschüssigen Zinkcarbonat abfiltriert. Das Filtrat scheidet beim Eindampfen die charakteristischen Krystalldrusen von fleischmilchsaurem Zink aus. Die Krystalle wogen: 0,088 g = 0,0559 g Milchsäure im Extrakt von 300 g = 0,0153%.

Die Lösung des Zinksalzes gab scharf die Uffelmannsche Reaktion.

II. 5,97 g Extrakt von 500 g Mark wurden mit heißem Wasser behandelt, filtriert, Filtrat mit Bleiessig gefällt, filtriert, Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert und eingeengt auf etwa 5 ccm, dann zur Krystallisation in der Kälte stehen gelassen; es schied sich eine geringe Menge krystallinischer Niederschlag ab, der aber keine Kreatininreaktion ergab. Das Filtrat davon wurde mit 3 Vol. Alkohol gefällt; es entstand ein flockiger Niederschlag, der heiß abfiltriert, im Wasser gelöst und wiederum heiß mit Alkohol gefällt wurde; die alkoholischen Filtrate wurden vereinigt einige Tage stehen gelassen; danach war ein geringer, an der Wand haftender Niederschlag

erschienen; die alkoholische Lösung wurde abgegossen, der Niederschlag in Wasser gelöst, gibt typische Scherersche Inositprobe; ebenfalls positiv fällt die Seidelsche Probe aus. Das alkoholische Filtrat vom Niederschlag wurde mit Äther bis zur geringen bleibenden milchigen Trübung versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Es hatten sich typische Insitkrystalle abgesetzt in geringer Menge.

IV. Die Eiweisskörper des Knochenmarkes.

Zur Isolierung der Eiweißkörper des roten Knochenmarkes wurde dasselbe nacheinander ausgezogen mit: Wasser, Sodalösung, Chlorammoniumlösung, Salzsäurelösung.

100 g frisches rotes, im Mörser gut durchgemischtes Knochenmark wurden mit 200 ccm eiskaltem destilliertem Wasser versetzt und 4 Stunden in der Kälte stehen gelassen; dann wurde filtriert, der Rückstand abermals im Mörser mit 200 ccm eiskaltem Wasser verrieben, wiederum 4 Stunden in der Kälte stehen gelassen, filtriert und der Rest nochmals in gleicher Weise mit 100 ccm Wasser 2 Stunden behandelt. Sämtliche Filtrate wurden vereinigt. (Wasserauszug.)

Der Rückstand von der Wasserbehandlung wurde zweimal mit 200 ccm Sodalösung von 0,15 % verrieben filtriert, dann der Rest mit 200 ccm kaltem Wasser über Nacht stehen gelassen. (Sodaauszug). Der davon bleibende Rückstand wurde nun mit 15 % Salmiaklösung zweimal 4 Stunden ausgezogen und filtriert. (Salmiakauszug). Der Rest wurde nun durch Auswaschen mit Wasser vom überschüssigen Salmiak befreit und dann mit ganz verdünnter Salzsäure (1 ccm HCl von 1,19 auf 250 ccm Wasser) ausgezogen. (Salzsäureauszug 1.)

Zum Schluß wurde dann noch der Rest mit 200 ccm Salzsäure von 0,8 % behandelt; in der Kälte stehen gelassen, filtriert. (Salzsäureauszug 2.)

Die Untersuchung der einzelnen Auszüge ergab nun folgendes:

1. Wasserauszug.

Die schwach rötlich gefärbte Lösung gibt beim Erhitzen eine Trübung bei 55° C (Albumin), eine zweite stärkere Trübung bei etwa 84° C (Globulin). Ein Teil der wässerigen Lösung

wurde gefällt mit einem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung; nach etwa 4stündigem Stehen in der Kälte hatte sich ein reichlicher flockiger Niederschlag abgesetzt, der abfiltriert wurde. Das Filtrat koagulierte in der Wärme. Die Lösung trübt sich beim Erwärmen bei etwa 56 bis 58° C, bei 82 bis 83° C erfolgt flockige Ausscheidung, deren Filtrat keine Biuretreaktion ergab.

Der Niederschlag durch Ammoniumsulfat wurde durch wenig Wasser gelöst, filtriert, eine Probe des Filtrats koaguliert bei 73 bis 76° C; nunmehr wurde diese ganze Lösung unter Essigsäurezusatz koaguliert, filtriert; das Filtrat koaguliert nicht mehr, gibt aber schöne rötlich-violette Biuretreaktion. Mit Kochsalz gesättigt läßt diese Lösung nichts ausfallen; nach dem Ansäuren mit Essigsäure dieser kochsalzhaltigen Lösung erfolgt die Abscheidung eines Niederschlages (Deuteroalbumose). Im Wasserauszug waren also vorhanden:

Serumalbumin,
Serumglobulin,
Deuteroalbumose.

2. Sodalösung.

Auf Zusatz von 10 % Essigsäure erfolgt eine beträchtliche Fällung; dieselbe wurde absitzen gelassen, filtriert, getrocknet und gewogen; sie wog 0,0133 g = 0,0133 %.

Das Pulver wurde in zwei Teile geteilt; ein Teil gelöst in $^n/_{10}$-Natronlauge, mit Salzsäure versetzt, gekocht und filtriert, das Filtrat mit Ammoniak übersättigt und mit Silbernitrat versetzt; die Lösung färbt sich etwas braun; nach längerem Stehen scheidet sich ein braun gefärbter geringer Niederschlag ab. Ein zweiter Teil des Pulvers wurde mit Soda und Salpeter verascht, in Salzsäure gelöst, mit Ammoniak übersättigt und mit Magnesiamixtur gefällt: deutlicher krystallinischer Niederschlag; eine kleine Portion von der zweiten mit Soda und Salpeter veraschten, in Salzsäure gelösten Probe wurde mit Rhodanammonium versetzt; es entsteht eine blutrote Fe-Färbung. Die Reagenzien waren selbstverständlich auf Eisenfreiheit geprüft. Die Lösung gibt ferner Orcin- und Phloroglucinreaktion. Setzt man zur Orcinprobe einen Tropfen Eisenchloridlösung und schüttelt mit Amylalkohol aus, färbt

sich dieser smaragdgrün. Im Sodaauszug findet sich also ein eisenhaltiges Nucleoproteid, das Pentosen enthält.

3. Salmiakauszug.

Der Salmiakauszug koaguliert nicht beim Kochen, auch nicht nach Essigsäurezusatz; in große Menge destillierten Wassers gegossen erfolgt keine Abscheidung. Der Auszug gibt weder Millons- noch Biuret- noch Xanthoproteinreaktion. Myosin ist als nicht im Knochenmark enthalten.

4. Salzsäureauszug I

gibt keine Eiweißfarbenreaktion; keine Fällung mit Alkohol, Kaliumquecksilberjodid und Salzsäure, schwefelsaurem Ammonium, Natronlauge 30 %; keine Fällung beim Neutralisieren mit Soda; keine Wärmekoagulation.

Salzsäureauszug II (mit 0,8 % HCl).

Der Auszug gibt ganz schwache Biuretreaktion, keine Fällung mit Kaliumquecksilberjodidsalzsäure, keine mit Ammoniak; eine leichte Trübung mit 30 % Natronlauge, nach Stehen hat sich ein geringer flockiger Niederschlag abgesetzt, der filtriert und in ein wenig heißem Wasser gelöst wird. Die Lösung gibt keine Millonsche Reaktion, schwache Biuretreaktion, Serumalbuminlösung wird ganz fein flockig gefällt, Ovalbuminlösung dagegen nicht. Aller Wahrscheinlichkeit handelt es sich also um Parahiston.

Über das Vorkommen von Mucin im Knochenmark findet sich in der Literatur nur bei Botazzi eine Angabe, der anführt, daß Bustinski dasselbe nachgewiesen habe. Zum Nachweis wurden 150 g rotes Mark 3 Tage lang mit 300 ccm halbgesättigter Kalkwasserlösung in der Kälte ausgezogen, dann filtriert, das Filtrat mit überschüssiger Essigsäure gefällt; der flockige Niederschlag wurde abfiltriert in $^{n}/_{100}$-Natronlauge gelöst, mit Salzsäure übersättigt und gekocht, dann filtriert, das Filtrat mit Alkohol gefällt, filtriert, Filtrat eingedampft, abfiltriert: das Filtrat reduziert deutlich Fehlingsche Lösung. Der durch Kalkwasser aus dem Kochenmark ausgezogene Körper war also Mucin.

Bei gewissen Erkrankungen des Knochenmarks kommt wie bekannt der sog. Bonce-Jonessche Eiweißkörper im Harn vor; Versuche, denselben im normalen Knochenmark nachzuweisen, verliefen alle negativ. Fleischer fand denselben im Rinder-, Pferde- und Menschenmark.

V. Die Fette des Knochenmarks.

a) Gesamtfettgehalt des Markes.

1. 30 g rotes Knochenmark liefern bei der Extraktion mit Äther: 27,927 g = 93,09 %.

2. 30 g ebenso behandeltes gaben 27,610 g Ätherextrakt = 92,06 %.

3. 5 g liefern 4,570 g = 91,4 %.

4. 125 g gelbes Mark liefern Ätherextrakt 123,37 g = 98,7 %.

5. 100 g vorher mit Wasser ausgekochtes Mark liefern 91,44 g = 91,44 %.

6. 300 g rotes mit Wasser ausgekochtes Mark liefern 277,8 g = 92,57 %.

7. 100 g halbflüssiges gelbes Mark gaben 97,5 g Ätherextrakt nach vorherigem Auszug mit Wasser = 97,5 %.

Im Mittel berechnet sich also für rotes Ochsenmark: 92,11 %; für gelbes Ochsenmark 98,10 % Gesamtfettgehalt.

Das Fett des roten Knochenmarks ist weiß, ziemlich konsistent, das des gelben Markes halbflüssig, gelb. Die Farbenreaktionen des Fettes des gelben und des roten Markes weichen etwas voneinander ab.

	Rot:	Gelb:
NO_3H (D 1,2)	zunächst keine Einwirkung, Fett wird farblos	zunächst keine Einwirkung, allmählich färbt sich das gelbe Fett grünlich
NO_3H rauchend (30 Tropfen Fett, 12 „ Säure)	rötlichbraun	grünblau, allmählich rötlich
H_2SO_4 (15 Tropfen Fett in CS_2, 5 Tropfen H_2SO_4 vom spez. Gw. 1,6—1,7)	farblos bis schwach rötlichbraun, dann rötlichviolett	grünblau, allmählich rötlich werdend

	Rot:	Gelb:
$H_2SO_4 + HNO_3$:	grünbraun, dann violett	grünblau
$ZnCl_2$:	keine Einwirkung	keine Reaktion
PO_4H_3 (sirupförmig)	keine Einwirkung	keine Reaktion
$AgNO_3$:	keine Einwirkung	keine Reaktion
HCl + Rohrzucker:	keine Einwirkung	keine Reaktion
Phosphormolybdänsäure + Chloroform	gelbgrün (Farbe der Phosphormolybdänsäure)	smaragdgrün, kein Grenzring.

Bei der Elaidinprobe wird das Fett des roten Knochenmarkes fest in einer Stunde, ist grünlichweiß, das des gelben Knochenmarks wird erst fest nach etwa 16 Stunden, ist grünlichblau.

Die Refraktometerzahlen, festgestellt mit dem Refraktometer nach Abbé von Zeiß, ergaben sich für:

frisches rotes Mark bei 40° C	47,8
	48,0
Fett aus rotem Mark „ „ „	48,5
	47,0
Fettsäure aus rotem Markfett bei 40° C	48,5
	47,0
Fett aus gelben Mark „ „ „	51,4
	50,8
	53,2
Dasselbe bei 25° C	59,0
	60,2
	59,2
Fette Säuren aus gelbem Knochenmarkfett bei 40° C	38,2
	40,4

Die Dichte, die nach Hager in der Weise bestimmt wurde, daß das geschmolzene Fett oder Knochenmark in verdünnten Alkohol gegossen und dieser dann so lange verdünnt wurde, bis

die Fettkügelchen sich schwebend erhielten in der Flüssigkeit, ergab sich:

für gelbes Markfett bei 15° C zu 0,9150
„ weißes bzw. rotes Markfett zu 0,9200
„ Fettsäuren aus gelbem Markfett 0,9050
„ Fettsäuren aus rotem Markfett 0,9090—0,9100.

Schmelz- und Erstarrungspunkte der Fette.

	Fett aus rotem Knochenmark	Fett aus gelbem Knochenmark	Fette Säuren aus rotem Mark	Fette Säuren aus gelbem Mark
Schmelzpunkt . .	39—43°	22—25°	45—47°	33—35°
Erstarrungspunkt	29—30°	19°	39 - 40°	29—30°

Schmelz- und Erstarrungspunkt wurden im Capillarröhrchen bestimmt.

Bestimmung der Säurezahl.

1. 0,905 g Fett aus rotem Knochenmark in Ätheralkohol, verbrauchten 0,25 ccm $^{n}/_{10}$-KOH, auf Ölsäure berechnet ist die Säurezahl danach 0,78.

2. 1,233 g verbrauchten 0,35 ccm $^{n}/_{10}$-KOH,
Säurezahl: 0,80.

3. 4,84 g verbrauchten 1,1 ccm KOH,
Säurezahl: 0,64,
Mittelwert also: 0,74.

Die Zahlen beziehen sich auf frisches Mark.

Bestimmung der Verseifungszahl.

a) 2,028 g rotes Knochenmarkfett wurden verseift mit 10 ccm Kalilauge, von der 5 ccm 48,7 $^{n}/_{1}$-HCl entsprechen, und 100 ccm Alkohol; in einer Viertelstunde ist die Verseifung beendet. Zum Zurücktitrieren wurden verbraucht 90,2 ccm; gebunden vom Fett waren also: 7,2 ccm KOH,
Verseifungszahl 198,7.

b) 1,5100 g Fett aus rotem Knochenmark brauchten bei gleicher Behandlung 5,3 ccm KOH,
Verseifungszahl 196,5.

c) 1,2000 g Fett aus rotem Knochenmark + 5 ccm KOH = 47,4 ccm $^n/_1$-HCl), zurücktitriert mit 43,1 ccm Säure, verbraucht also: 4,3 ccm KOH,

Verseifungszahl 196,0.

d) 1,425 g ebenso behandeltes verbrauchten 4,6 KOH,

Verseifungszahl 196,5.

e) 1,478 g + 5 ccm KOH (= 30,6 ccm $^n/_1$-HCl) 100 Alkohol; zurücktitriert mit 25,4 ccm Säure, verbraucht also: 5,2 ccm KOH,

Verseifungszahl 197,0.

f) 1,106 g ebenso behandelt; zurücktitriert mit 26,7 ccm HCl, verbraucht 3,9 ccm KOH,

Verseifungszahl 197,4.

Die mittlere Verseifungszahl für Fette aus rotem Knochenmark beträgt also danach: 197,4.

g) 2 g gelbes Knochenmarkfett wurden verseift mit 50 ccm KOH und 50 ccm Alkohol. 50 ccm KOH entsprechen 36,9 ccm $^n/_2$-HCl; zurücktitiert mit 23,35 ccm $^n/_2$-HCl, verbraucht also 13,55 ccm,

Verseifungszahl 189,7.

h) 2 g gelbes Knochenmarkfett ebenso behandelt unter Verwendung der gleichen Kalilauge, verbrauchten 13,60 ccm KOH,

Verseifungszahl 190,4.

Die mittlere Verseifungszahl des gelben Knochenmarkes ist demnach: 190,4.

Für die aus den Fetten abgeschiedenen fetten Säuren ergaben sich folgende Zahlen.

1. Für rotes Markfett:

a) 201,6
b) 203,7
c) 200,9
d) 202,3

Mittelwert: 202,15

2. Für gelbes Markfett:

a) 189,0
b) 189,7
c) 189,6
d) 189,0
e) 189,0

Mittelwert: 189,26

Bestimmung der Hehnerzahl.

a) 9,565 g frisches Knochenmark wurden mit 50% KOH verseift, die fetten Säuren abgeschieden, getrocknet und gewogen; das Gewicht der erhaltenen Fettsäuren betrug: 8,73 g = 91,27% im frischen roten Mark.

b) 50 g frisches gelbes Mark ergaben 45,47 g fette Säuren = 90,94%.

c) 3,1250 g trockner Ätherextrakt von rotem Mark ergaben 3,0130 g fette Säuren,

Hehnerzahl: 96,41.

d) 2,9420 g Ätherextrakt vom roten Knochenmark ergaben 2,8185 g fette Säuren,

Hehnerzahl demnach: 95,8,

Mittelwert der Hehnerzahl: 96,1.

Bestimmung der Reichert-Meißl-Zahl.

	Fett aus rotem Knochenmark	Fette Säuren aus rotem Knochenmark
R.-M.-Z.:	0,55	0,22
	0,55	0,275
Mittel:	0,55	Mittel: 0,247

	Fett aus gelbem Knochenmark	Fette Säuren aus gelbem Knochenmark
R.-M.-Z.:	0,55	0,33
	0,55	0,385
Mittel:	0,55	Mittel: 0,357

Bestimmung der Jodzahl.

a) Rotes Knochenmarkfett.

1. 0,824 g Fett in Cloroform gelöst, mit 25 ccm Jodlösung versetzt, von der 10 ccm 18,45 ccm Thiosulfatlösung entsprachen; zurücktritiert mit 23,3 Thiosulfatlösung, absorbiert also 0,3321 g Jod.

Jodzahl: 38,5.

2. 0,807 g Fett absorbieren 0,3180 g Jod,

Jodzahl: 39,4.

3. 1,0980 g Fett absorbieren 0,46139 g Jod,

Jodzahl: 41,9.

4. 0,9026 g Fett absorbieren 0,35957 g Jod,
Jodzahl: 39,8.

5. 0,9435 g Fett absorbieren 0,36127 g Jod,
Jodzahl: 38,1.

6. 1,085 g Fett absorbieren 0,45847 g Jod,
Jodzahl: 42,2.

Mittlere Jodzahl des roten Markfettes: 39,98.

b) Gelbes Knochenmarkfett.

1. 1,0100 g Fett absorbieren 0,67564 g Jod,
Jodzahl: 66,9.

2. 1,0200 g Fett absorbieren 0,68072 g Jod,
Jodzahl: 66,73.

Mittlere Jodzahl des gelben Knochenmarkfettes: 66,86.

c) Fette Säuren aus dem roten Knochenmark.

1. 1,0500 g absorbieren 0,50185 g Jod,
Jodzahl: 47,7.

2. 1,122 g absorbieren 0,53594 g Jod,
Jodzahl: 47,7.
Mittelzahl: 47,7.

d) Fette Säuren aus gelbem Knochenmark.

1. 1,0200 g absorbieren 0,71534 g Jod,
Jodzahl: 70,1.

2. 1,141 g absorbieren 0,80264 g Jod,
Jodzahl: 70,3,
Mittelwert: 70,2.

Bestimmung der Acetylzahl.

Die Bestimmung der Acetylzahl wurde nach Lewkowitsch in der Weise vorgenommen, daß etwa 10 g Fett mit der doppelten Menge Essigsäureanhydrid $1^1/_2$ Sunde am Rückflußkühler erhitzt, die Lösuug dann mit 500 ccm siedendem Wasser vermischt und unter CO_2-Durchleitung noch eine halbe Stunde erhitzt wurde. Danach wurde das Wasser abgehebert, die Ölschicht so lange mit Wasser ausgekocht — ein dreimaliges

Auskochen ist gewöhnlich völlig ausreichend — bis auf Lackmuspapier keine saure Reaktion mehr nachweisbar ist; im Trockenschrank wurde dann durch trocknes Filter filtriert, eine aliquote Menge, annähernd 5 g, des acetylierten Fettes mit einer gemessenen Menge alkoholischen Kalis verseift, zu der verseiften Masse dann die der verwandten Kalilösung äquivalente Menge Normalsäure gesetzt und erwärmt. Die abgeschiedenen Fettsäuren wurden abfiltriert, mit siedendem Wasser bis zum Verschwinden der Säureaktion ausgewaschen und das Filtrat mit $^n/_{10}$-Kali titriert.

I. Verwandt wurde ausgelassenes rotes Mark.

3 g acetyliertes Mark verseift mit 25 ccm alkohol. KOH = 270,5 $^n/_2$-HCl; zurücktitriert mit 19,5 ccm $^n/_{10}$-KOH,

Acetylzahl: 36,46.

II. 2,8 g acetyliertes Fett verseift mit 15 ccm alkohol. Kali; zurücktitriert mit 16,5 $^n/_{10}$-KOH,

Acetylzahl: 33,05.

III. 3,5 g acetyliertes Fett verseift mit 25 ccm alkohol. KOH; titriert mit 20,5 $^n/_{10}$-KOH,

Acetylzahl: 32,86.

Mittlere Acetylzahl für rotes Knochenmarkfett: 34,12.

Bestimmung der fetten Säuren.

Für die Zusammensetzung der Fettsäuren aus Markfett fand Mohr:

Ölsäure	63%
Palmitinsäure	22%
Stearinsäure	10%

Eine ältere Analyse von Dammer gibt für die Zusammensetzung des Markfettes an:

Ölsäure	24%
Stearin- und Palmitinsäure	76%

Benedict-Ulzer erwähnt die Fettsäure aus Knochenmark als bestehend aus:

Ölsäure	40%
Stearinsäre	35%
Palmitinsäure	25%

I. Zur Bestimmung der Fettsäuren wurden 10,0120 g Fett aus rotem Knochenmark verseift mit Kalilauge, erhalten wurden 9,5900 g fette Säuren; diese wurden in die Bleiseifen übergeführt, mit Äther bis zur Erschöpfung ausgezogen, die ungelösten Bleiseifen abfiltriert, die ätherische Lösung mit verdünnter Salzsäure geschüttelt, die Ätherschicht abgelassen, mit Wasser nochmals im Scheidetrichter geschüttelt, der Äther dann im Kohlensäurestrom abdestiliert, der Rückstand getrocknet und gewogen; er wog 4,544 g = 47,38% Ölsäure.

Die ungelösten Bleiseifen wurden in heißem Alkohol zerteilt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, heiß filtriert, das Filtrat zur Trockene mit Soda verdampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und erhitzt, dann in der Hitze mit Salzsäure im Überschuß gefällt. Nach dem Erkalten werden die Säuren abfiltriert durch ein gewogenes Filter, getrocknet und gewogen. Das Gewicht betrug 4,9440 g. Das Säuregemisch wurde nochmals aus Alkohol umkrystallisiert und der Schmelzpunkt bestimmt. Die Masse schmolz bei 60,3 bis 60,4 C, der Erstarrungspunkt lag bei 56,5. Legt man die Heinz'sche Tabelle zugrunde, so bestand das Gemisch aus 60% Stearinsäure und 40% Palmitinsäure, das macht auf 4,944 g berechnet:

2,9664 g Stearinsäure,
1,9776 g Palmitinsäure.

Zur genaueren Bestimmung wurden nun die Fettsäuren (ca. 2 g) gelöst in heißem Alkohol, die Lösung gefällt mit $^2/_7$ vom Gewicht der Fettsäuren mit Bariumacetat, der Niederschlag abfiltriert, die Fettsäuren daraus abgeschieden, gewogen, der Schmelzpunkt bestimmt; das unvollständig gefällte alkoholische Filtrat wurde dann mit einem Überschuß von Bariumacetat gefällt, filtriert, wiederum die Fettsäuren abgeschieden, filtriert, getrocknet, gewogen, der Schmelzpunkt bestimmt. Die fraktionierte Fällung muß mehrmals wiederholt werden. Ich erhielt so aus 1,7164 g Substanz:

1,1836 g Stearinsäure,
0,5328 g Palmitinsäure,

daraus berechnet sich für das Fett aus rotem Knochenmark:

Ölsäure	47,38%
Stearinsäure	36,25%
Palmitinsäure	16,36%

II. Die Bestimmung der Fettsäuren im Fett des gelben Knochenmarkes wurde auf gleiche Weise ausgeführt.

11,5520 g gelbes Markfett ergaben 11,0896 g fette Säuren; davon waren Ölsäure 8,6450 g = 77,95 %. Der Schmelzpunkt des 2,311 g wiegenden Fettsäuregemisches nach Abscheidung der Ölsäure lag bei 55 bis 56 C, der Erstarrungspunkt bei 51 bis 54 C; nach der Heinzschen Tabelle bestand die Masse demnach etwa aus 30 % Stearinsäure, 70 % Palmitinsäure.

Die genauere Bestimmung durch fraktionierte Fällung ergab in 1,3152 g Gemisch:

0,8490 g Stearinsäure,
0,4662 g Palmitinsäure.

Danach bestand das Fett aus gelbem Knochenmark aus:

77,95 % Ölsäure,
14,22 % Stearinsäure,
7,83 % Palmitinsäure.

Bestimmung des Cholesterin.

I. Rotes Knochenmarkfett.

14,4350 g Markfett wurden mit Kalilauge verseift, nach beendigter Verseifung mit Wasser verdünnt, die Lösung mit Äther ausgeschüttelt, der Äther dann abgelassen, die ätherische Lösung verdunstet, der Rückstand mit heißem Wasser ausgezogen, filtriert, der Filterrückstand mit heißem Alkohol in Lösung gebracht, Alkohol verdunstet und der Rückstand getrocknet und gewogen. Der Rückstand wog:

0,0330 = 0,2286 %.

Es gab sämtliche für Cholesterin charakteristische Reaktionen schön und ausgeprägt.

II. 50 g rotes Knochenmarkfett ergaben 0,1710 g
= 0,3420 % Cholesterin.

III. Gelbes Knochenmarkfett.

10,3345 g ergaben bei gleicher Behandlung 0,0320 g
= 0,3097 % Cholesterin.

IV. 50 g gelbes Mark ergaben 0,1420 g
= 0,2840 % Cholesterin.

Im Mittel also für rot: 0,2853 %, für gelb: 0,2968 %.

Bestimmung des Lecithins.

Eine genaue und absolut einwandfreie Bestimmung des Lecithins in den tierischen und pflanzlichen Geweben und Säften existiert bis heute nicht. Die sicherste und annähernd die richtigsten Resultate liefernde Methode besteht immer noch in der Digestion der Organe mit Alkohol und nachfolgender Äther- oder Chloroformbehandsung sowie Bestimmung des Phosphorgehaltes in dem Extrakt; einerseits ist diese Methode jedoch sehr langwierig; es ist auch nicht ganz sicher, ob wirklich alles Lecithin in die Lösungsmittel übergeht, andererseits ist sicher, daß auch andere phosphorhaltige Körper, wie Iecorin, Protagon, in dem Extrakt zu finden sein werden, die dann als Lecithin mit bestimmt werden; der Fehler, der dabei begangen wird, ist nun allerdings nicht schlimm; denn im allgemeinen neigt man doch mehr und mehr der Ansicht zu, daß es sich bei Körpern wie Iecorin nicht um eine einheitliche Substanz, sondern um ein Gemenge von Lecithin und Zucker, resp. anderen Körpern handelt. In letzter Zeit haben sich swei Forscher mit der Bestimmung des Lecithins im Knochenmark beschäftigt, Otolski, der den mittleren Lecithingehalt des Pferdeknochenmarks zu 0,12—0,14% findet, und ferner Glikin, der für das Pferdemarkfett die bedeutend höhere Zahl von 1,45%, für Rindermarkfett 2,45% angibt. Glikin bestimmte das Lecithin durch Veraschung des Fettes nach Neumann und Bestimmung des Phosphors in der Asche als Ammoniummolybdophosphat.

Zur Bestimmung des Lecithins im Rindermark habe ich dasselbe zuerst 4 Stunden bei 60° C und völlig neutraler Reaktion mit Alkohol ausgezogen, dann den Alkohol abgegossen, verdunstet bei 60° C und neutraler Reaktion; der Rückstand von der Alkoholbehandlung wurde dann 6 Stunden mit Chloroform heiß extrahiert, filtriert, das Chloroform verdunstet, der Rückstand von der Alkohol- sowie der Chloroformbehandlung wurde nochmals mit reinem Chloroform aufgenommen, filtriert, das Chloroform verdunstet und der Extrakt mit Soda und Salpeter in der Platinschale vorsichtig verascht. Bei vorsichtigem Veraschen mit Soda- und Salpetergemisch ist die Gefahr des Verlustes durch Verspritzen weniger leicht vorhanden als bei der Neumannschen Säureveraschung und zog ich die erstere Methode deshalb vor.

I. 20,2700 g frisches rotes Rinderknochenmark lieferten

0,0045 g $P_2O_7Mg_2$

= 0,0029 g P_2O_5

entsprechend 0,032 9614 g Lecithin oder 0,1576 %.

II. 25 g frisches rotes Rinderknochenmark lieferten

0,0050 g $P_2Mg_2O_7$

= 0,003 23 g P_2O_5

entsprechend 0,036 711 218 g Lecithin oder 0,1469 %

III. 40 g frisches rotes Knochenmark vom Rind lieferten

0,0164 g $Mg_2P_2O_7$

— 0,010 58 g P_2O_5

entsprechend 0,120 25 g Lecithin oder 0,3006 %.

IV. 24,6700 g frisches gelbes Rindermark lieferten

0,0055 g $Mg_2P_2O_7$

— 0,003 55 g P_2O_5

entsprechend 0,040 35 g Lecithin oder 0,1636 %.

V. 25,0 g frisches gelbes Rindermark lieferten

0,0070 g $P_2Mg_2O_7$

— 0,0045 g P_2O_5

entsprechend 0,051 15 g Lecithin oder 0,2046 %:

Im Durchschnitt ergibt sich demnach für

rotes Knochenmark vom Rind 0,2017 %

gelbes „ „ „ 0,1841 % Lecithin.

Bei einem Kaninchen fand ich den Lecithingehalt des Knochenmarks einmal zu 4,53 % im frischen Mark; ein zweites Mal zu 1,00 %, das Mark dieses Tieres kam nicht sofort zur Verarbeitung; bei einem Igel, den ich zu anderen Versuchen benutzte, sogar einen Prozentgehalt des frischen Marks von 41,7 %; ich werde darüber nächstens weiter berichten.

Die Bestimmung des Glykogens.

Über den Glykogengehalt des Knochenmarks liegen nur zwei Angaben vor; Händel wies in Pflügers Laboratorium für das Knochenmark des Rindes einen Glykogengehalt von 0,0306 % nach, Gierke und Katsurada leugnen dagegen das Vorkommen von Glykogen im Knochenmark. Zur Bestimmung des Glykogens verfuhr ich genau nach Pflügers Vorschriften; bei der Verseifung mit 60 %iger Kalilauge entsteht

aus dem Knochenmark eine große Menge Seifengallerte; da ich befürchten mußte, daß diese Masse eine gewisse Quantität Glykogen mechanisch mit einschließen konnte, filtrierte ich die Seife von der Lauge, bestimmte das Glykogen in letzterer, löste dann die ziemlich schwer lösliche Seife in Wasser und bestimmte in einem aliquoten Teil dieser Seifenlösung nach den Vorschriften Pflügers das Glykogen.

I. Verarbeitet wurden 200 g frisches rotes Knochenmark; im alkalischen Filtrat wurde das Glykogen gefällt, vorschriftsmäßig ausgewaschen, gelöst in 150 ccm HCl von 2,2 %; in 81 ccm Zuckerlösung fand sich:

0,0510 g Cu_2O
= 0,0180 g Zucker
= 0,0167 g Glykogen

in 150 ccm Zuckerlösung also 0,0309 g in 200 g Mark. Die Seife wurde gelöst in 6600 ccm Wasser, 500 ccm nach Vorschrift gefällt, der Niederschlag mit 100 ccm HCl 2,2 % gelöst; 81 ccm dieser Lösung lieferten:

0,0110 g CuO,
annähernd 0,003 g Zucker
in 81 ccm, in 100 also 0,0037 g Zucker
= 0,00343 g Glykogen
in 500 ccm Seifenlösung, in 6600 also;
0,452 g,
insgesamt sind in 200 g Mark enthalten gewesen also
0,0861 g oder 0,0381 %,

II. 100 g rotes Rindermark lieferten aus in der alkoholischen Lösung gefälltem, in 100 ccm HCl 2,2 % gelöstem Glykogen:

0,0405 g Cu_2O in 81 ccm
= 0,0136 g Zucker,
in 100 ccm also 0,0168 g Zucker
= 0,0156 g Glykogen.

Die Seife wurde gelöst in 3000 ccm H_2O, 500 ccm gefällt; sie lieferten:

0,015 g CuO,
annähernd 0,00375 g Zucker
in 81 ccm, in 100 ccm also 0,0046 g
= 0,0043 g Glykogen

in 500 ccm Seifenlösung, in 3000 also:

0,0258 g,

Insgesamt sind in 100 g rotem Rindermark vorhanden gewesen:

0,0414 g

= 0,0414 %,

Im Mittel beträgt der Glykogengehalt des roten Knochenmarkes demnach: 0,0398 %,

Bestimmung des Eisens im roten Knochenmark.

Die Eisenbestimmung geschah im frischen Knochenmark nach der Säureveraschungsmethode von Neumann. Es wurden gefunden für 100 g Mark:

rotes Mark	gelbes Mark
Eisen in Milligramm	
12,78	15,80
15,00	12,03
14,40	10,62
15,40	11,07
17,90	6,73
10,85	6,00
Mittel: 14,388	3,70
	5,30
	5,55
	Mittel: 8,533

Das Rinderbluthämoglobin hat nach den Untersuchungen von Hüfner und Jacquet einen mittleren Eisengehalt von 0,336 %. Der colorimetrisch bestimmte Hämoglobingehalt im Knochenmark beträgt etwa 1 %, Müller berechnet 10 % Blut; unter Berücksichtigung dieser Zahlen entspräche diesem Hämoglobingehalt ein Eisengehalt von 0,00437 g. Der tatsächliche Eisengehalt ist aber bedeutend höher und ist auf das Vorhandensein der im Mark vorkommenden eisenhaltigen Nucleoalbumine zurückzuführen.

Ptomaine.

Zieht man frisches Knochenmark mit heißem, schwach salzsäurehaltigem Wasser aus, filtriert, macht mit NH_3 stark alkalisch und schüttelt mit Amylalkohol aus, so erhält man nach Verdunsten des Amylalkohols einen Rückstand, dessen Menge um so größer wird, je älter das in Arbeit genommene

Knochenmark ist, bzw. je länger es gestanden hat. Der Auszug mit heißem salzsäurehaltigem Wasser aus Knochenmark gibt sowohl mit frisch bereiteter Gerbsäurelösung wie mit frischer Phosphormolybdänsäurelösung eine sofortige Trübung, nach etwa einer Stunde einen feinflockigen weißen Niederschlag, Reaktionen, die auf das Vorhandensein von Ptomainen deuten.

Aus 100 g ganz frischem Knochenmark wurden erhalten:

0,005 g Rückstand
= 0,05 %.

Aus 30,4 g Knochenmark, das schon länger gestanden hatte:

0,102 g
= 0,3355 %

Fermente des Knochenmarks.

In fetthaltigen Geweben, wie Knochenmark, subcutanem und mesenteriellem Fettgewebe usw., kommt wie im Blutserum, Pleuraexsudat nach Bitry-Schliatko ein lipolytisches Ferment vor, das künstliche Fette als Triacetin, Tributyrin u. a. m. leichter spaltet als natürliche. Die Wirkung der Knochenmarklipase folgt der Schütz-Borrisowschen Regel, d. h. die Wirkung ist proportional der Quadratwurzel der Fermentmenge. Jochmann und Müller fanden im Knochenmark von Hunden proteolytisches Ferment, das den Nagern, den Paarzehern, Unpaarzehern und Vögeln abgeht. Dieses Ferment stellen die Verfasser in Beziehung zu den im Knochenmark vorkommenden Leukocyten. Ciaccio suchte bei seinen Untersuchungen über Enterokinase auch im Knochenmark nach dieser, fand es aber frei davon. Beitzke und Neuberg beschäftigten sich mit der Frage, ob Antifermente synthetisierend wirken können; sie konnten dies nachweisen bei invertierenden Antifermenten; negativ aber verlief das Ergebnis bezüglich steatolytischer Fermente; sie konnten durch ein durch Injektion von Steapsin an Knaninchen erzeugtes Antilipaseserum Glycerin und Ölsäure nicht zu Fett aufbauen. Versuche, die ich anstellte, durch Injektion von Knochenmarks-Lipase, erhalten durch Digestion des Knochenmarks mit Kochsalzlösung, in das Peritoneum von Kaninchen von diesen ein Ölsäure und Glycerin zu Fett synthetisierendes Serum zu erhalten, sind bis jetzt erfolglos geblieben, doch sind die Versuche noch nicht abge-

schlossen, und hoffe ich darüber demnächst weiter berichten zu können.

Bei der Ausführung der Analysen bin ich von Frl. Haensel bestens unterstützt worden.

Literatur.

Gorup-Besanez, Lehrb. d. physiol. Chem.
Halliburton, Chem. Physiol.
Liebermann, Chem. d. Menschen.
Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem.
Botazzi, Physiol. Chem.
Neumeister, Lehrb. d. physiol. Chem.
Fränkel, Deskriptive Biochem.
Nasse, Jahresb. f. Tierchem. 1877.
König, Chem. d. menschl. Nahrungs- u. Genußmittel.
Zink, Forschungen über Lebensmittel u. ihre Beziehungen z. Hygiene usw. 3, 441—443.
Eylert, Wittsteins Vierteljahrsschrift f. prakt. Pharm. 9, 330.
Mohr, Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 390.
Ivar Bang, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 362—377.
Wohlgemuth, J., Arbeiten a. d. pathol. Institut z. Berlin 1906.
Orville Harry Brown u. Charles Claude Guthrie, amerik. Journ. of Physiol. 14, 328—338.
Orville Harry Brown u. Don R. Joseph, amerik. Journ. of Physiol. 16, 110—116.
Schumann, O., Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 175—203.
Paul Th. Müller, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 454—480.
Forest, Journ. of Physiol. 17.
Halliburton, ebenda 18.
Salkowski, Arch. f. Heilk. 11, 1.
Heymann, P., Pflügers Archiv 6, 184.
Salomon, Zeitschr. f. physiol Chem. 2, 172.
Händel, Pflügers Archiv, 92, 104—114.
Pflüger, Glykogen u. seine Beziehungen z. Diabetes.
Gierke, Das Glykogen, Habilitationsschrift 1905.
Hüfner u. Jacquet, Archiv. f. Physiol. 1894.
Bitry-Schliatko, W. A., Contribution à l'étude de la lipase, Archiv d. sciences biolog. St. Petersbourg 11, 370.
Müller, Paul Th., Über das Wirkungsgesetz d. Serum u. Gewebslipasen Sitzungsbericht d. Wien. Akad. 114, Abt. III, 717.
Fleischer, Virchows Archiv 80.
Bitry-Schliatko, Archiv d. sciences biolog. St. Petersbourg 11, 370.
Jochmann u. Müller, Münch. med. Wochenschr. Nr. 41.
Beitzke u. Neuberg, Virchows Archiv 133, 161.
Ciaccio, Compt. rend. 60, 676.

Bemerkung
zur Mitteilung der Herren M. Kumagawa und K. Suto

über „Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierischem Material nebst der Kritik einiger gebräuchlichen Methoden".

Von

J. C. Berntrop,

erster Assistent am chem. Laboratorium des städt. Gesundheitsamtes zu Amsterdam.

(Eingegangen am 1. April 1908.)

In dieser Zeitschrift (**8**, 212, 1908) haben die obengenannten Herren auf S. 220 der erwähnten Abhandlung einen Extraktionsapparat beschrieben, welcher dem Soxhletschen gegenüber den Vorteil haben soll, daß die Extraktion bei annähernder Siedetemperatur der zu prüfenden Extraktionsmittel stattfindet. Hierzu möchte ich bemerken, daß der hier als neu beschriebene Apparat sich in fast gleicher Form schon vorfindet in meiner Abhandlung: „Über die Bestimmung des Fettgehaltes von Weizenbrot und die Beantwortung der Frage, ob dasselbe mit Milch, mit Wasser oder unter Hinzufügung eines anderen Fettes als Milchfett gebacken ist" (Zeitschr. f. angew. Chem. **1902**, Heft 6) und ebenda auf S. 122 beschrieben wird. Der letztgenannte Apparat unterscheidet sich noch insofern günstig von dem der Herren Kumagawa und Suto, indem bei ihm die Extraktion genau bei der Temperatur des siedenden Extraktionsmittels stattfindet, da die Papierhülse, welche den zu extrahierenden Stoff enthält, während des Ausziehens von der kochenden Flüssigkeit umspült wird. Ich beabsichtige, demnächst noch einige kleine Verbesserungen, welche ich im Laufe der Zeit an dem Apparat angebracht habe, in der Zeitschr. f. angew. Chem. zu veröffentlichen.

Die Verteilung des Lecithins im tierischen Organismus.

Von

Dr. med. et phil. **Joseph Nerking.**

(Aus der biochemischen Abteilung des Instituts für experimentelle Therapie zu Düsseldorf.)

(Eingegangen am 7. April 1908.)

Dem Lecithin, das ebenso wie Kohlenhydrate und Eiweiß in fast allen Zellen des tierischen und pflanzlichen Organismus sich findet, kommt für den Gesamtstoffwechel sicher eine bedeutsame Rolle zu, die mit fortschreitender Erkenntnis der chemischen und physiologischen Eigenschaften immer mehr erschlossen wird. Bekanntlich ist Gobley der erste gewesen, der das Lecithin aus Eidotter, wenn auch vorerst nur in wenig gereinigtem Zustand, darstellte und als phosphorhaltigen Fettkörper beschrieb; die Reindarstellung, soweit man von solcher sprechen kann, ist erst später Hoppe-Seyler und Diakonow gelungen. Seitdem ist der Körper in einer Reihe tierischer Organe nachgewiesen worden; besonders war es Thudichum, der das Lecithin und dessen Derivate näher studierte und eine Fülle neuer Beobachtungen und Untersuchungen mitteilte. B. und A. Danilewskis Arbeiten verdanken wir die Erkenntnis der Wirkung des Lecithins auf die Assimilation der Nährstoffe und des Einflusses auf die roten Blutkörperchen bzw. des Hämoglobins. In neuester Zeit erst hat das Lecithin ein erhöhtes Interesse gefunden durch die unter Ehrlichs genialer Leitung gemachte hochbedeutungsvolle Entdeckung von Preston Kyes, der das Verhalten des Lecithins bei der Hämolyse aufklärte und feststellte, daß Lecithin als aktivierendes Agens für Cobragift anzusehen ist. In den Pflanzen, und zwar im Samen wurde das Lecithin zuerst von Knop 1860 aufgefun-

den; später fand Töpler die ganz allgemeine Verbreitung des Körpers im Pflanzenreiche; Hoppe-Seyler fand es in Hefe und suchte den Nachweis zu führen, daß Chlorophyll ein dem Lecithin nahe verwandter Stoff sei. Pilze und Bakterien wurden ebenfalls lecithinhaltig gefunden. Verbindungen von Lecithin mit Eiweiß, Lecithalbumin, die durch Behandlung mit Alkohol nur teilweise gespalten werden und auch gegen verdünnte Alkalien verhältnismäßig widerstandsfähig sein sollen, hat Liebermann aus verschiedenen tierischen Organen zu isolieren versucht. Bing beschrieb Lecithinkohlenhydrat- und Lecithinglykosidverbindungen, die sich künstlich darstellen lassen und zu denen Bing auch das von Drechsel entdeckte, von Baldi näher studierte Jecorin rechnet, das übrigens nach der heute vorherrschenden Ansicht ein Gemenge zu sein scheint. Die Abscheidung und Bestimmung des Lecithins bietet einige Schwierigkeiten, ganz einwandfrei in bezug auf quantitative Analyse im strengen chemischen Sinn dürfte wohl keine der bekannten Methoden zur Bestimmung des Lecithins sein. Am meisten angewandt und wohl auch am zuverlässigsten ist noch das Ausziehen der auf Lecithin zu prüfenden trocknen Materie mit Alkohol mit anschließender Extraktion mit Äther, Chloroform oder dgl., Verdunsten der vereinigten Auszüge und Bestimmung des Phosphorgehaltes des Extraktes. Die Bestimmung als Cadmiumlecithinat, ursprünglich von Thudichum angegeben, später von Bergell wieder eingeführt und verbessert, hat sich nicht in allen Fällen als anwendbar erwiesen. Einer allgemeinen Anwendung, wo es sich um möglichst genaue quantitative Bestimmung handelt, ist ebensowenig die Methode von Altmann und später Zuelzer fähig, die beide das Lecithin zu reinigen und von den begleitenden Fetten zu trennen versuchten durch Fällung aus Chloroform- oder Ätherlösung mit Aceton. Die Fällung des Lecithins mit Aceton ist nie vollständig, wofür ich später den analytischen Beweis liefern werde. Für den Lecithingehalt der verschiedenen Organe des Tierkörpers finden sich bei Fränkel „Descriptive Biochemie" folgende Angaben:

Muskel	0,4 —0,75%
Submaxillardrüse . . .	0,97—1,0%
Pankreas	0,55%
Sehr junge Testikel . .	1,35%

Junge Testikel	1,0%
Alte Testikel	0,67%
Lunge	1,1%
Niere	1,2%
Leber	0,8—1,5%.

Rubow fand den Ätherextrakt des Herzens bestehend aus 60—70% Lecithin, beträchtlich höher als den Lecithingehalt der quergestreiften Muskeln. Bei einem Rohfettgehalt, auf Trockensubstanz berechnet, des Herzens von 11,7—13,4% finden sich nach Krehl 4,2—4,6%, nach Rubow sogar 8% Lecithin. Weyl und Zeitler fanden im frischen Kaninchenmuskel 0,65—0,8% Lecithin, auf Trockensubstanz berechnet macht dies 3—4%. In der Niere fand Rubow einen Lecithingehalt von 6,6—8,63% der Trockensubstanz. Für das Gehirn fand Thudichum für die graue Substanz an Lecithin, Kephalin und Myelin 0,78%, für die weiße: Kephalin, Lecithin und Cholesterin 11,49%. Für die Trockensubstanz des menschlichen Ischiadicus fand Chevalier 33,57% Lecithin. In der Leber beträgt der Lecithingehalt nach Noël Paton 2,35%; Heffter fand für frische Leber des Kaninchens im Durchschnitt 2,20%, mit dem Maximum von 3,07%, dem Minimum von 1,53%. Gefunden wurde das Lecithin ferner in der Galle, dem Eidotter, der Thymusdrüse, der Nebenniere, die viel Lecithin enthalten soll, im Blut (etwa 0,2%), in der Milch (0,058%), als Lecithalbumin in der Niere und Magenschleimhaut, ferner im Auge, und zwar der Linse, besonders in Kataraktlinsen. Bei den Pflanzensamen fand Schulze:

Lupinus luteus	1,55—1,59%
Glycine hispida	1,64%
Vicia sativa	1,22—0,74%
Pisum sativum	1,23%
„ unreif	0,50%
Lens esculenta	1,20%
Vicia faba	0,81%
Cannabis sativa	0,88%
Cucurbita Pepo, geschält	0,43%
Sesamum indicum	0,56%
Triticum vulgare	0,65%
„ Keim allein	1,55%

Secale cereale	0,57%
Hordeum distichum	0,74%
Zea mays, gelb	0,25%
„ „ weiß	0,28%
Fagopyrum esculentum, geschält	0,47%
Linum usitatissimum	0,88%
Helianthus annuus, geschält	0,44%
Papaver somniferum	0,25%

Teilweise noch höhere Zahlen fanden Merlis und v. Bitto. Außer in den Samen kommen die Lecithine auch in anderen Organen höherer Pflanzen regelmäßig vor; in der Bierhefe fand Hoppe-Seyler 0,314% Lecithin.

Da ich über den Gesamtgehalt an Lecithin im tierischen Körper in der Literatur keine Angabe finden konnte, stellte ich mir die Aufgabe, diesen zu bestimmen und die Verteilung auf die einzelnen Organe zu ermitteln. Die Methode, die ich dabei anwandte, bestand darin, daß ich das Material (gesamtes Tier oder einzelnes Organ) zunächst fein zerkleinerte durch mehrmaliges Bearbeiten in der Wurstmaschine oder bei einzelnen Organen durch Zerschneiden mit Messer und Schere, dann entweder in dünner Schicht ausgebreitet bei 60° C oder im Vakuum trocknete, den Trockenrückstand dann zuerst 6 bis 12 Stunden bei 60° C mit Alkohol von 96% Tr auszog, wobei auf neutrale Reaktion geachtet wurde. Der Alkohol wurde dann abfiltriert, der Filterrückstand wieder bei 60° C getrocknet, dann fein pulverisiert und 12 Stunden mit Chloroform oder Äther ausgezogen. Der Alkoholauszug wurde bei 60° C verdunstet, der Rückstand mit Chloroform oder Äther ausgezogen, filtriet und das Filtrat dann mit dem zweiten Chloroform bzw. Ätherauszug vereinigt. Schließlich wurde das Lösungsmittel bei 60° C verdunstet, der Rückstand getrocknet und mit der mehrfachen Menge Soda-Salpetermischung vorsichtig verascht, in der Asche dann die Phosphorsäure als pyrophosphorsaure Magnesia über die Stufe des Ammoniummolybdophosphates bestimmt. In der Hoffnung, das Lecithin aus der Chloroformlösung mit Aceton auszufällen und so von den Fetten zu trennen und durch direkte Wägung zu bestimmen, stellte ich mit reinem in Chloroform gelösten Lecithin folgende Versuche an:

I. 0,7698 g Lecithin, in CCl_3H gelöst, mit dem 3- bis 4-fachen Volumen Aceton gefällt, nach 1 Stunde filtriert. Filterrückstand wog getrocknet:

0,3666 g
= 47,61 % des angewandten Lecithins;

das Aceton-Chloroformfiltrat wurde verdunstet, der Rückstand wog getrocknet:

0,3961 g
= 51,44 % des angewandten Lecithins.

II. 0,8768 g reines trockenes Lecithin, ebenso behandelt, nur mit dem 8 fachen Volumen Aceton gefällt. Die Fällung wog getrocknet:

0,4242 g
= 48,38 % des angewandten Lecithins;

das Chloroformacetonfiltrat ergab:

0,4401 g trockenen Rückstand
= 50,19 % des angewandten Lecithins.

Nach diesen Resultaten mußte ich auf die Ausfällung des Lecithins durch Aceton zur quantitativen Bestimmung verzichten.

I. Versuch.

Bestimmung des gesamten im Tier vorhandenen Lecithins.

Ein graues, belgisches, 1460 g schweres Kaninchen wurde durch Nackenschlag getötet, rasch abgezogen und das ganze Tier dann mit Haut und Haaren und Knochen mehrmals durch die Wurstmaschine getrieben, bis ein ziemlich gleichmäßiger Brei entstanden war. Der Magendarmkanal sowie die Blase des Tieres wurden sowohl in diesem wie in allen folgenden Versuchen sorgfältig entleert; der Inhalt wog 165,0 g. Der Organbrei wog 1267 g, die mit $2^1/_2$ l Alkohol von 96 % Tr bei 60° C und neutral gehaltener Reaktion 6 Stunden ausgezogen wurden, dann filtriert, das alkoholische Filtrat bei 60° C verdunstet, der Rückstand in CCl_3H aufgenommen; das mit Alkohol ausgezogene Pulver wurde bei 60° C getrocknet, gepulvert, nunmehr wog der Rückstand 348 g, die mit 1 l Chloroform extrahiert wurden. Dieser Chloroformauszug wurde mit dem in CCl_3H aufgenommenen Rückstand von dem Alkohol-

auszug vereinigt, das Chloroform verdunstet, die Phosphorsäure im Rückstand bestimmt. Es fand sich darin:

0,1808 g $Mg_2P_2O_7$
= 1,3144 g Lecithin.

Der Rückstand von der Chloroformbehandlung wurde abermals gepulvert, Gewicht dann 345 g. 30 g davon wurden abermals mit 300 ccm Alkohol von 96 % Tr bei 60° C und neutraler Reaktion ausgezogen, der Rückstand dann nochmals mit Chloroform; der in CCl_3H aufgenommene Alkoholrückstand mit dem zweiten Chloroformauszug vereinigt, das Chloroform verdunstet und die Phosphorsäure in der Asche bestimmt; es ergab sich:

0,0476 g $P_2Mg_2O_7$
= 0,3461 g Lecithin in 30 g, in
345 g demnach:
3,9802 g Lecithin;

insgesamt enthielt das Tier also:

5,2946 g Lecithin oder:
0,3626 % vom Lebendgewicht.

II. Versuch.

Ein 3020 g schweres Kaninchen wurde verarbeitet; der Tierbrei wog 2814 g, die in genau gleicher Weise behandelt wurden wie in Versuch I. Der nach der Alkoholextraktion verbleibende trockene Rückstand wog 1074 g, die mehrmals möglichst fein gepulvert wurden; 50 g des gut durchgemischten Pulvers wurden sodann wieder wie beschrieben extrahiert. Aus dem in Chloroform gelösten ersten Alkoholextrakt wurden bei der Veraschung erhalten:

0,5552 g $P_2Mg_2O_7$
= 4,0363 g Lecithin.

Aus dem Extrakt der 50 g restierenden Pulvers:

0,0520 g $Mg_2P_2O_7$
= 0,3780 g Lecithin,

folglich waren in der Gesamtmenge von 1074 g mit Alkohol vorbehandelten Pulvers enthalten:

8,1194 g,

insgesamt enthielt das Tier:

12,1557 g Lecithin oder:
0,4025 % vom Lebendgewicht.

III. Versuch.

Ein 420 g schwerer Igel wurde nach Entleerung des Magen-Darmkanals und der Blase gemahlen; der Brei wog 396,2 g, die wie beschrieben behandelt wurden; der nach der Alkoholbehandlung verbleibende trockene Rückstand wog 108,845 g, die 12 Stunden lang in 3 Soxhletapparaten mit Chloroform extrahiert wurden; dieser Chloroformauszug wurde mit dem in Chloroform aufgenommenen Alkoholauszug vereinigt, das Chloroform verdunstet; Rückstand verascht, ergab:

0,4510 g $Mg_2P_2O_7$
= 3,2788 g Lecithin oder:
0,7995 g % vom Lebendgewicht.

IV. Versuch.

Ein 1450 g schweres Kanichen wurde durch Nackenschlag getötet; das Tier dann rasch abgezogen, ausgeweidet, Magen-Darmkanal und Blase entleert. Die einzelnen Organe wurden oberflächlich mit Fließpapier abgetrocknet und gewogen, dann zerkleinert, bei 60° C getrocknet, dann wie früher ausgezogen und der Phosphorgehalt der Extrakte bestimmt.

Organ	Gewicht in g Lebend	Gewicht in g Trocken	Im Extrakt gefundene $Mg_2P_2O_7$ in g	Lecithin in g	Lecithin in % des frischen Organs	Lecithin in % des trockenen Organs
Lunge	6,8	1,7	0,014	0,1018	1,5	5,99
Herz	3,95	1,10	0,0085	0,0618	1,58	5,618
Gehirn . . .	8,63	2,675	0,0452	0,3286	3,807	12,23
Rückenmark .	3,08	0,95	0,0440	0,3199	10,38	33,62
Nieren . . .	9,04	2,3	0,0136	0,0989	1,094	4,30
Milz	0,77	0,22	0,0010	0,0073	0,935	3,27
Augen	4,54	0,81	0,0034	0,0247	0,544	3,05
Magen . . .	18,12	5,4	0,0196	0,1528	0,843	2,67
Leber	51,02	13,775	0,0800	0,5816	1,14	4,22
Darm	93,1	23,28	0,0154	0,1119	0,12	0,48
Galle	0,72	0,105	Spuren	Spuren	—	—
Blut	46,92	7,15	0,0090	0,0654	0,14	0,914
Muskeln . . .	499,246	110,565	0,4072	2,9603	0,593	2,68
Knochen . .	110,37	76,0	0,0296	0,2152	0,195	0,283
Fell	174,92	73,0	0,0570	0,4144	0,237	0,568
Knochenmark	2,1	—	0,0131	0,0952	4,53	—

Gesamtlecithingehalt in den untersuchten Organen:
5,5398 g oder:
0,382 % vom Lebendgewicht des Tieres.

V. Versuch.

Ein 3480 g schweres Kaninchen wurde in genau gleicher Weise verarbeitet wie im vorhergehenden Versuch. Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle:

Organ	Gewicht in g Lebend	Gewicht in g Trocken	Im Extrakt gefundene $Mg_2P_2O_7$ in g	Lecithin in g	Lecithin in % des frischen Organs	Lecithin in % des trocknen Organs	
Herz	10,455	2,785	0,0234	0,1701	1,627	6,108	
Gehirn . . .	12,24	3,81	0,066	0,4798	3,92	12,593	
Rückenmark .	4,86	1,58	0,073	0,5807	11,948	36,75	
Nieren . . .	20,66	5,71	0,045	0,3272	1,58	5,73	
Lungen . . .	19,895	5,145	0,042	0,3053	1,54	5,93	
Magen . . .	33,77	7,93	0,043	0,3126	0,925	3,94	
Leber	164,39	46,14	0,2170	1,5776	0,959	3,42	
Blut	49,91	9,66	0,0108	0,0785	0,1575	0,813	
Hoden . . .	12,41	3,77	0,0176	0,1279	1,03	3,39	
Nebennieren .	0,485	0,21	0,0016	0,0116	2,39	5,54	
Darm	203,66	80,65	0,0862	0,6267	0,308	0,777	
Milz	1,69	0,42	0,0030	0,0218	1,29	5,20	
Augen	5,77	0,66	0,0012	0,0087	0,15	1,32	
Muskeln . . .	1562,9	390,75	0,0438 } in 2-mal 50 g 0,0438 }	0,3184 } in 50 g 0,3184 }	0,624	2,49	Gesamt-Lecithin d. Muskels 9,7473 g
Knochen . .	253,215	172,2	0,0616	0,4478	0,177	0,260	
Fell	368,0	168,0	0,0908	0,6601	0,179	0,392	
Knochenmark	11,406	—	0,0140	0,1018	0,89	—	

Der Gesamtlecithingehalt des Kaninchens betrug demnach 15,586 g = 0,4478 % des Lebendgewichts.

Im Mittel aus zwei Analysen ergibt sich für die einzelnen Organe des Kaninchens demnach:

	Prozentgehalt an Lecithin	
	Lebend	Trocken
Lunge . . .	1,52	5,96
Herz . . .	1,603	5,863
Gehirn . . .	3,863	12,41
Rückenmark .	11,164	35,18
Nieren . . .	1,34	5,02

	Prozentgehalt an Lecithin	
	Lebend	Trocken
Milz . . .	1,19	4,23
Augen . . .	0,35	2,19
Leber . . .	1,07	3,82
Magen . . .	0,884	3,31
Darm . . .	0,214	0,629
Blut. . . .	0,149	0,863
Muskeln . .	0,609	2,59
Knochenmark	2,71	—
Knochen . .	0,186	0,271
Fell	0,208	0,480
Nebennieren .	2,39	5,54
Hoden . . .	1,03	3,39

VI. Versuch.

Bei einer Katze von ca. 2500 g Gewicht wurde in genau gleicher Weise wie im 4. und 5. Versuche bei dem Kaninchen der Lecithingehalt der Organe bestimmt. Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle:

Organ	Gewicht in g Lebend	Gewicht in g Trocken	Im Extrakt gefundenes $Mg_2P_2O_7$ in g	Lecithin in g	Lecithin in % des frischen Organs	Lecithin in % des trockenen Organs
Leber	85,25	23,87	0,1640	1,1923	1,39	4,99
Milz	7,46	1,85	0,0010	0,0073	0,09	0,39
Nieren . . .	17,85	4,83	0,0416	0,3024	1,69	6,26
Gehirn . . .	23,45	7,72	0,1446	1,0512	4,48	13,74
Rückenmark .	8,89	3,23	0,1164	0,8463	9,52	26,20
Herz	9,83	2,75	0,0172	0,1250	1,27	4,55
Lunge	15,96	3,57	0,0300	0,2181	1,36	6,10
Nebennieren .	0,186	0,069	—	0,0037	1,98	5,36

Bei der Nebenniere wurde das Lecithin aus der konzentrierten Chloroformlösung mit Aceton gefällt und gewogen.

VII. Versuch.

Ein 410 g schwerer Igel wurde in gleicher Weise auf den Lecithingehalt seiner Organe untersucht wie in den vorhergehenden Versuchen Kaninchen und Katze. Die erhaltenen Werte finden sich in folgender Tabelle zusammengestellt:

Organ	Gewicht in g Lebend	Gewicht in g Trocken	Im Extrakt gefundenes $Mg_2P_2O_7$ in g	Lecithin in g	Lecithin in % des lebenden Organs	Lecithin in % des trockenen Organs
Herz	3,05	0,61	0,0088	0,0640	2,09	10,49
Leber	23,49	6,53	0,0470	0,3417	1,454	5,23
Lunge	10,68	2,14	0,0126	0,0916	0,858	4,28
Milz	3,935	0,865	0,0078	0,0567	1,44	6,56
Nieren. . . .	5,41	1,19	0,0140	0,1018	1,88	8,55
Gehirn. . . .	2,75	0,515	0,0158	0,1149	4,18	22,31
Rückenmark .	0,45	0,16	0,0040	0,0291	6,47	18,19
Hoden. . . .	2,99	0,51	0,0079	0,0577	1,92	11,27
Magen. . . .	4,19	0,73	0,0064	0,0465	1,11	6,37
Darm	22,97	3,67	0,0072	0,0553	0,2411	1,508
Nebennieren .	0,13	0,03	0,0038	0,0276	21,23	92,00
Galle	0,49	0,065	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
Knochenmark	0,15	—	0,0086	0,0625	41,7	—
Muskeln . . .	150,0	40,5	0,2068	1,5034	1,002	3,71
Knochen . .	31,0	21,2	0,0254	0,1847	0,596	0,871
Fell	170,0	103,55	0,0834	0,6063	0,356	0,585

Der Gesamtlecithingehalt des Igels in den untersuchten Organen betrug also: 3,3677 g oder 0,8214 % des Lebendgewichts.

Bemerkenswert ist der hohe Lecithingehalt im Knochenmark und den Nebennieren des Igels. Im frischen Igelblut fand ich:

0,265 % und
0,213 % Lecithin.

Die Summe der festen Bestandteile des Blutes betrug in zwei Versuchen: 22,51 % und 19,93 %. Das Igelblut ist äußerst viskös und erstarrt schon nach wenigen Sekunden zu einer Gallerte.

Auffallend ist der hohe Gesamtlecithingehalt des Igels. Bekanntlich gilt der Igel, als wenn auch nicht absolut immun, so doch ziemlich giftfest gegen Schlangengift. Nach den Kyesschen und Sachsschen Untersuchungen über das sog. Cobralecithid erwartete ich beim Igel nur wenig oder gar kein Lecithin anzutreffen, gerade das Gegenteil aber ist der Fall. Ist nun das Lecithin des Igels anders beschaffen als sonst aus

Tierorganen gewonnenes oder enthält der Igel und besonders das Blut andere die aktivierende Tätigkeit des Lecithins bei der Hämolyse durch Cobragift hemmende oder aufhebende Substanzen, und dabei denke ich in erster Linie an Mucin oder Glykogen; ist überhaupt die so oft behauptete Giftfestigkeit des Igels richtig. Die weitere Frage ist, ob zwischen diesem Igellecithin und Cobragift auch das von Kyes in seiner interessanten und grundlegenden Arbeit beschriebene Lecithid sich bildet oder ob Differenzen zwischen den einzelnen Lecithinarten, deren es sicher mehrere gibt, in bezug darauf bestehen. Die Prüfung aller dieser Fragen habe ich in Angriff genommen und werde denmächst darüber berichten.

Studien über das amylolytische Ferment im Hafer.

Von

Paul Klempin.

(Aus dem Physiologischen Institut der Kgl. Tierärztlichen Hochschule in Berlin.)

(Eingegangen am 10. April 1908.)

Bei den Studien über die proteolytischen Fermente in einigen pflanzlichen Nahrungsmitteln[1]) hatten wir aus Hafer einen Glycerinextrakt dargestellt, der sich nicht allein proteolytisch, sondern auch amylolytisch als sehr wirksam erwies.

Geschroteter Hafer, Hafermehl erwies sich weniger günstig, wurde 24 Stunden in einer elektrisch betriebenen Kugelmühle mit einem Gemisch gleicher Teile Wasser und Glycerin möglichst intensiv zermahlen, der feste Rückstand alsdann in einer Filterpresse abgepreßt und das ablaufende, trübe Filtrat in hohen Zylindern durch Sedimentieren geklärt. Die nach einigen Tagen abgeheberte, braungelbe Flüssigkeit wurde durch Wattebauschen noch mehrmals filtriert.

Dieser so dargestellte Glycerinextrakt erwies sich auch nach wochenlanger Aufbewahrung im Eisschranke amylolytisch wirksam gegen Stärkelösung.

Obwohl die Methodik noch viel zu wünschen übrig ließ, so hat sich doch schon eine Reihe von Forschern dem Studium der Pflanzendiastasen gewidmet und eine Zahl interessanter Probleme gelöst. Ich erinnere nur an die Arbeiten Ellenbergers[2]) auf diesem Gebiete, die für die spätere Erforschung

---

[1]) Aron und Klempin, Diese Zeitschr. 9, 163, 1908.

[2]) Ellenberger, Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. 13, 188; 14, 62; 20, 23. — Jahresb. d. Gesellsch. f. Natur- und Heilk., Dresden 1886/87, 160. — Skandin. Arch. f. Physiol. 18, 306.

der pflanzlichen Enzyme grundlegend geworden sind. Wie Ellenberger bereits gezeigt hat, ist durch die Mitwirkung der amylolytischen Pflanzenfermente bei der Verdauung die bedeutende Amylolyse zu erklären, die im Digestionstractus, speziell im Magen der Pflanzenfresser stattfindet. Auf die große Bedeutung dieser Pflanzenfermente, die in ihrer Wirkung noch mächtiger sind als z. B. das proteolytische Ferment im Hafer, hier weiter einzugehen, halte ich nicht für notwendig, sondern verweise auf die Arbeiten Ellenbergers, in denen die Wichtigkeit dieses Enzymes gebührend gewürdigt wird.

Von Interesse erschien es mir, die Wirkungsweise des Fermentes weniger vom praktischen, als mehr vom theoretischen Standpunkt zu untersuchen, d. h. festzustellen, in welcher Weise die Temperatur, die Zeitdauer und die Fermentmenge die Wirkung des Fermentes beeinflussen.

Die Frage nach dem Temperaturoptimum war schon durch Hofmeister[1]) untersucht worden. Hofmeister studierte die Wirkung des Fermentes bei 16 bis 18°, 39 bis 40°, 50 bis 60° und 60 bis 75°. Höher hinauf ging er nicht. Er fand, daß das Optimum der Wirkung bei Körpertemperatur liegt.

Die Frage nach dem Einfluß von Zeit und Fermentmenge war insofern von Interesse, als unsere Kenntnisse von dem Einfluß dieser beiden Faktoren auf die Fermente noch keineswegs sichere sind. — So behaupten z. B. beim Trypsin die einen Forscher (Vernon[2]), Oppenheimer und Aron[3])) dieses folge dem sog. Schütz-Borissowschen Gesetze[4]), andere (Volhard[5]), Löhlein),[6] Groß[7])) wieder, es folge ihm nicht. Es schien mir daher der Mühe wert, zu versuchen, diese Frage für die Nahrungsmittelfermente zu lösen.

Um zu erkennen, ob das Enzym in dem Glycerinextrakt überhaupt auf Stärke einwirkt, stellte ich folgenden Versuch

---

[1]) Hofmeister, Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. 20, 23.

[2]) Vernon, Journ. of Physiol. 26, 405, 1901.

[3]) Oppenheimer und Aron, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 279.

[4]) Huppert und Schütz, Pflügers Archiv 80, 470.

[5]) Volhard, Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 9, 403.

[6]) Löhlein, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 120 bis 143.

[7]) Groß, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 58, 157, 1907.

an: Zwei Erlenmeyerkolben A und B mit je 100 ccm einer 10%igen Stärkelösung wurden mit 150 ccm Extrakt versetzt. A wurde $^1/_2$ Stunde im Wasserbade erhitzt, B dagegen blieb ungekocht; das Enzym konnte also in B seine volle Wirksamkeit entfalten. Beide Kolben verblieben 24 Stunden im Brutschranke, der eine Temperatur von 39° besaß. Nach dem Herausnehmen wurde auch in B das Enzym durch $^1/_2$ stündiges Kochen getötet und dann wurde, wie vor dem Einstellen in A, jetzt auch in B das Volumen wieder auf 250 ccm gebracht. Der Inhalt beider Kolben wurde dann mit essigsaurem Blei gefällt, mit Kaolin durchgeschüttelt[1]) und durch Wattebauschen abfiltriert. Polarimetrisch stellte ich dann fest, daß das Filtrat B eine um 1,7° stärkere Drehung zeigte als das Filtrat A. Also hatte tatsächlich das im Glycerinextrakt enthaltene Enzym einen Teil der Stärke in Zucker verwandelt.

Bei meinen folgenden Versuchen bediente ich mich einer einfacheren

Methodik,

indem ich das Prinzip der in jüngster Zeit von Wohlgemuth[2]) beschriebenen Methode anwandte.

Zur Herstellung der Stärkelösung benutzte ich die „lösliche Stärke" von Kahlbaum. 5 g Stärke wurden in etwas kaltem destillierten Wasser gelöst und darin verrührt, bis sich eine gleichmäßige Suspension gebildet hatte und diese Masse dann unter Umrühren in ein Gefäß mit kochendem Wasser gegossen. Nach Abspülen der Gefäße usw. und Erkaltenlassen der Flüssigkeit wurde diese in einen Maßkolben gespült, mit kaltem destillierten Wasser nachgespült und die Flüssigkeit auf 500 ccm aufgefüllt. So erhielt ich eine 1%ige Stärkelösung, die sich bei Zusatz von etwas Thymol längere Zeit hielt. Trotzdem habe ich aus Zweckmäßigkeitsgründen immer wieder von Zeit zu Zeit frische Lösungen hergestellt.

Der **Gang der Untersuchung** gestaltete sich folgendermaßen:

Eine bestimmte Anzahl von Reagensgläsern wurden mit je 1 ccm Stärkelösung und mit ansteigenden Mengen des Glycerinextraktes beschickt. Dann wurden sämtliche Gläser mit einer Mischung von gleichen Teilen Glycerin und Wasser auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und gleich in ein Gefäß mit kaltem Wasser gestellt. Die Anwendung des kalten Wassers sollte eine vorzeitige Fermentwirkung verhindern.

---

[1]) Rona und Michaelis, Diese Zeitschr. 5, 366, 1907.

[2]) Wohlgemuth, Diese Zeitschr. 9, 1, 1908.

Dann kamen die Röhrchen gleichzeitig in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur und verblieben darin eine festgesetzte Zeit. Nach dem Herausnehmen kamen sie wieder alle in kaltes Wasser, so daß die Fermentwirkung überall gleichzeitig koupiert wurde. Nach dem Abkühlen kam in jedes Gläschen die gleiche Anzahl von Tropfen einer $^1/_{10}$ Normal-Jodlösung, dann wurde umgeschüttelt. Hierauf wurde der „limes", d. h. die unterste Grenze der Wirksamkeit bestimmt. Diejenigen Gläschen, die keinen blauen Farbenton zeigten, wurden als „verdaut" betrachtet.

Abweichend von der Wohlgemuthschen Methode habe ich meine Gläschen nicht nach dem Herausnehmen, sondern vor dem Einführen in das Wasserbad auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Dies erwies sich bei den größeren Mengenverhältnissen meiner Fermentlösung als geeigneter.

Ich habe ferner, wie schon angedeutet, nur das Prinzip der Wohlgemuthschen Methode benutzt. Die Versuche wurden stets so arrangiert, daß der Punkt bestimmt wurde, bei dem eine gleiche Menge Stärke (1 ccm der Lösung) in gleicher Konzentration verdaut worden war. An Stelle einer „Tüpfelprobe" erwies sich das von Wohlgemuth vorgeschlagene Verfahren als sehr bequem.

Sämtliche Versuche wurden in neutraler Reaktion vorgenommen, denn Scheunert und Grimmer[1]) haben durch ihre Untersuchungen gezeigt, daß das Ferment des Hafers auch bei alkalischer Reaktion wirksam, bei saurer dagegen unwirksam ist. Ein Versuch nach dieser Richtung hin erschien mir daher nicht notwendig.

Untersuchungsresultate.

Zuerst mußte ich feststellen, ob die Methode Wohlgemuths auch für mein Ferment anwendbar ist. Denn z. B. die Methode von Groß[2]) zur Bestimmung der Wirksamkeit des Trypsins, die im Prinzip darauf beruht, daß nach einer bestimmten Zeit das gesamte zugesetzte Eiweiß durch das Ferment verdaut ist, konnte, wie diesbezügliche Versuche zeigten, für das proteolytische Ferment des Hafers keine Anwendung finden, da dieses Ferment nur einen Teil vom zugesetzten Eiweiß verdaut, also niemals vollkommene Verdauung erreicht wird.

---

[1]) Scheunert und Grimmer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 27.
[2]) Groß, loc. cit.

Der Vorversuch gestaltete sich folgendermaßen:

Tabelle I.

Glas Nr.	Zeit	Stärkelösung (1% ig)	Extrakt-menge	Glycerin und Wasser	Bemerkungen
1	1 Std.	1 ccm	4 ccm	11 ccm	blau
2	1 „	1 „	5 „	10 „	blau
3	1 „	1 „	6 „	9 „	blauviolett
4	1 „	1 „	7 „	8 „	violett
5	1 „	1 „	8 „	7 „	limes
6	1 „	1 „	9 „	6 „	gelbrot
7	1 „	1 „	10 „	5 „	—
8	1 „	1 „	11 „	4 „	—

Aus diesem Versuche ergibt sich, daß 8 ccm der angewandten Fermentlösung nach 1 Stunde 1 ccm Stärkelösung (1%ig) völlig verdaut haben. Die Wohlgemuthsche Methode liefert also auch bei dem saccharifizierenden Ferment des Hafers scharfe Umschläge.

Um zu erfahren, ob es von Bedeutung ist, daß man auf ein bestimmtes Volumen auffüllt, setzte ich einen weiteren Versuch an (Tabelle II), der mit dem vorhergehenden genau übereinstimmte, nur wurde nicht mit Glycerin-Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt.

Tabelle II.

Glas Nr.	Zeit	Stärkelösung	Extrakt-menge	Bemerkungen
1	1 Std.	1 ccm	4 ccm	blau
2	1 „	1 „	5 „	blau
3	1 „	1 „	6 „	blauviolett
4	1 „	1 „	7 „	violett
5	1 „	1 „	8 „	limes
6	1 „	1 „	9 „	gelbrot
7	1 „	1 „	10 „	—
8	1 „	1 „	11 „	—

Ein Blick auf beide Tabellen zeigt uns, daß es für die Bestimmung des limes gleichgültig ist, ob man auffüllt oder nicht, das Enzym ist stets gleich wirksam. Trotzdem habe ich bei allen Versuchen später auf 16 ccm aufgefüllt, weil es bei der Beurteilung des Farbentones von Bedeutung ist, stets die gleiche Konzentration zu haben.

Da pflanzliche Fermente oft bei sehr hohen Temperaturen besonders wirksam werden (Papayotin[1]), war es meine weitere Aufgabe, die Wirksamkeit des Fermentes bei verschiedenen Temperaturgraden kennen zu lernen.

Der Extrakt selbst, der im Eisschranke bei einer Temperatur von 4—6° C gewonnen wurde, war fast zuckerfrei. Das Enzym war also bei dieser Temperatur noch unwirksam.

Ein anderer Extrakt, der bei Zimmertemperatur aus Hafermehl hergestellt wurde, wies große Mengen Zucker auf. Da der Hafer für gewöhnlich nur Spuren von Zucker enthält,[2]) so ist dies ein Beweis dafür, daß das Enzym schon bei Zimmertemperatur, also bei etwa 15 bis 20°, wirksam ist. Es wurde dann durch je eine Versuchsreihe nach dem Schema, das Tabelle III zeigt, festgestellt, welche Extraktmengen erforderlich sind, um bei 25°, 30°, 35°, 40°, 45°, 50°, 60°, 70°, 75°, 80°, 85°, 90°, 95° und 100° die gleiche Menge (1 ccm) Stärkelösung vollständig zu verdauen.

Tabelle III.

Glas Nr.	Zeit	Stärkelösung (1%ig)	Extraktmenge	Glycerin u. Wasser zu gleichen Teilen
1	1 Std.	1 ccm	1 ccm	14 ccm
2	1 „	1 „	2 „	13 „
3	1 „	1 „	3 „	12 „
4	1 „	1 „	4 „	11 „
5	1 „	1 „	5 „	10 „
6	1 „	1 „	6 „	9 „
7	1 „	1 „	7 „	8 „
8	1 „	1 „	8 „	7 „
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
12	1 „	1 „	12 „	3 „
13	1 „	1 „	13 „	2 „
14	1 „	1 „	14 „	1 „
15	1 „	1 „	15 „	—

Die folgende Temperaturkurve gibt das Resultat dieser Versuche in übersichtlicher Form wieder:

[1]) Fuld, private Mitteilung. Siehe auch Hofmeister, Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. **20**, 25.

[2]) Ellenberger, Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. **18**, 188.

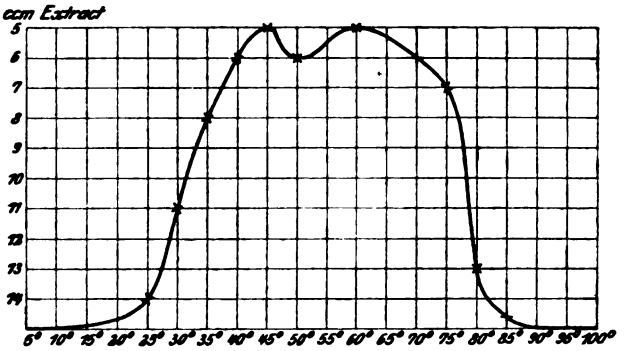


Fig. 1.

In der Figur geben die Zahlen auf der Abscisse die Temperaturgrade, die Zahlen auf der Ordinate dagegen die Kubikzentimeter an, welche erforderlich sind, um bei der betreffenden Temperatur völlige Verdauung herbeizuführen. Die Sterne bedeuten die durch die einzelnen Versuche festgestellten „limes"-Werte.

Die Temperaturkurve beginnt von 25° an rasch zu steigen und erreicht ihren Höhepunkt bei 45°, bleibt bis 70° etwa auf derselben Höhe und fällt dann wieder rasch. Bei 80° ist noch eine deutliche Wirksamkeit des Enzyms vorhanden, bei 85° ist dieselbe sehr gering (die letzten Gläser der Versuchsreihe waren etwas angedaut), verschwindet immer mehr und ist bei 90 bis 95° gleich Null.

Es ergibt sich demnach:

I. Das Optimum der Fermentwirkung liegt zwischen 40° und 70°.

II. Das Ferment hält hohe Temperaturgrade aus, ohne geschwächt zu werden; erst beim Erhitzen auf 90 bis 95° wird es vollkommen getötet.

Meine zweite Aufgabe war es nun, über die Beziehung, die zwischen Zeitdauer und Fermentmenge besteht, etwas zu erfahren. Mit anderen Worten, ich versuchte festzustellen, ob das Ferment bei seiner Wirksamkeit dem sog. Schütz-Borissowschen Gesetze[1]) folge oder nicht. Das Gesetz besagt bekanntlich, daß die Mengen der Verdauungsprodukte — in

[1]) Huppert und Schütz, loc. cit.

diesem Falle die Mengen des gebildeten Zuckers, Dextrins usw. — einerseits den Fermentmengen, andererseits den Quadratwurzeln aus den Zeiten proportional sind.

Versuchsanordnung.

Ich habe meine Versuche so arrangiert, daß ich bei steigenden Zeiten diejenige Fermentmenge festgestellt habe, welche notwendig ist, eine gegebene Menge Stärke vollkommen zu verdauen; mit anderen Worten, es wurde untersucht, wie derselbe Effekt bei steigenden Fermentmengen und fallenden Zeiten resp. bei fallenden Fermentmengen und steigenden Zeiten erreicht wird. Sämtliche Versuche wurden bei einer Temperatur von 39 bis 40° ausgeführt.

Zunächst wurde mit Fermentmengen um je 2 ccm ansteigend (s. Tabelle IV) festgestellt, innerhalb welcher Grenzwerte der zu erwartende Wert liegen mußte.

Tabelle IV.

Glas Nr.	Stärkelösung (1%ig)	Extraktmenge	Glycerin u. Wasser zu gleichen Teilen
1	1 ccm	1 ccm	14 ccm
2	1 „	3 „	12 „
3	1 „	5 „	10 „
4	1 „	7 „	8 „
5	1 „	9 „	6 „
6	1 „	11 „	4 „
7	1 „	13 „	2 „
8	1 „	15 „	—

Dann wurde durch einen zweiten Versuch der Wert zwischen den so ermittelten Grenzwerten, z. B. zwischen 5 und 7 ccm, bis auf $^1/_2$ ccm beschränkt (vgl. Tabelle V)

Tabelle V.

Glas Nr.	Stärkelösung	Extraktmenge	Glycerin u. Wasser zu gleichen Teilen
1	1 ccm	5 ccm	10 ccm
2	1 „	$5^1/_2$ „	$9^1/_2$ „
3	1 „	6 „	9 „
4	1 „	$6^1/_2$ „	$8^1/_2$ „
5	1 „	7 „	8 „

und schließlich, nachdem so die Grenze bis auf $^1/_2$ ccm gezogen worden war, der „limes“ durch eine 3. Versuchsreihe bis auf $^1/_{10}$ ccm genau bestimmt (vgl. Tabelle VI).

Tabelle VI.

Glas Nr.	Stärkelösung	Extraktmenge	Glycerin und Wasser zu gleichen Teilen
1	1 ccm	$5^5/_{10}$ ccm	$9^5/_{10}$ ccm
2	1 „	$5^6/_{10}$ „	$9^4/_{10}$ „
3	1 „	$5^7/_{10}$ „	$9^3/_{10}$ „
4	1 „	$5^8/_{10}$ „	$9^2/_{10}$ „
5	1 „	$5^9/_{10}$ „	$9^1/_{10}$ „
⋮	⋮	⋮	⋮
9	1 „	$6^3/_{10}$ „	$8^7/_{10}$ „
10	1 „	$6^1/_{10}$ „	$8^6/_{10}$ „
11	1 „	$6^5/_{10}$ „	$8^5/_{10}$ „

Versuchsresultate.

Es ergaben sich aus den Versuchen folgende Resultate:

Zeit	Menge des Extraktes, die erforderlich ist, um 1 ccm Stärkelösung ($1^0/_0$ig) zu verdauen
$^1/_2$ Stunde	7,3 ccm
1 „	5,3 „
2 Stunden	3,6 „
4 „	2,6 „
8 „	1,8 „

Nehmen wir jetzt als Einheit die Zeit $t = {}^1/_2$ Stunde und als Einheit der Fermentmenge $f = 0{,}9$ ccm Fermentlösung, so müßte sein, wenn das Ferment der Schütz-Borissowschen Regel folgen würde:

$$f \cdot \sqrt{t} = \text{Konst.}$$

Nun ist vollkommene Verdauung erreicht:

Stunden	Zeit Einheiten	Fermentlösung ccm	Fermentmenge Einheiten	$f \cdot \sqrt{t} = C$
$^1/_2$	1	7,3	8,1	$8{,}1 \cdot \sqrt{1} = 8{,}1$
1	2	5,3	5,9	$5{,}9 \cdot \sqrt{2} = 8{,}3$
2	4	3,6	4	$4 \cdot \sqrt{4} = 8{,}0$
4	8	2,6	2,9	$2{,}9 \cdot \sqrt{8} = 8{,}2$
8	16	1,8	2	$2 \cdot \sqrt{16} = 8{,}0$

Die erhaltenen Konstanten $C = f \cdot \sqrt{t}$ stimmen in allen Versuchen — wie die letzte Kolumne zeigt — gut überein, wir können deshalb wohl ohne Frage schließen, daß das Ferment sehr gut dem Schütz-Borissowschen Gesetze folgt.

Ergebnisse.

I. Das Optimum der Wirkung des in Form eines Glycerinextraktes dargestellten amylolytischen Haferfermentes liegt etwa zwischen 40°—70°. Hohen Temperaturen gegenüber ist das Ferment sehr resistent; erst bei einer Temperatur von 90 bis 95° wird es vollständig wirkungslos.

II. Verdauungsversuche mit Stärke ergeben, daß das Ferment der Schütz-Borissowschen Regel folgt: $f \cdot \sqrt{t} = \text{Konst}$

Ich bin dem wissenschaftlichen Assistenten des Instituts, Herrn Dr. Aron, unter dessen Leitung ich meine Versuche ausführte, zu lebhaftem Danke verpflichtet und gestatte mir, demselben auch an dieser Stelle Ausdruck zu geben.

Zur Methodik der Destillation der Aminosäurenester mittels der Geryk-Pumpe.

Von

P. A. Levene und D. D. van Slyke.

(From the Rockefeller Institute for Medical Research, New York.)

(Eingegangen am 14. April 1908.)

Die großen Fortschritte in der Kenntnis von der Zusammensetzung der Proteine sind durch die Einführung der fraktionierten Destillation der Aminosäurenester von E. Fischer erreicht worden. — Die Konstruktion des zu diesem Zwecke gebrauchten Apparates ist von E. Fischer und Harries ausgearbeitet worden.[1]) — Um das hohe Vakuum bei der Destillation zu erhalten, ist der Gebrauch von flüssiger Luft erforderlich. — Dieses erwies sich als Nachteil, hauptsächlich an solchen Orten, wo die flüssige Luft nicht leicht zugänglich ist. — So ist ihre Beschaffung in New York eine sehr kostspielige und umständliche Aufgabe. — Nun schien es uns möglich, das Vakuum dadurch zu bewahren, daß man die Dämpfe, die nach Angaben von E. Fischer und Harries durch flüssige Luft kondensiert werden, nur mittels Schwefelsäure absorbiert. Das Gefäß, welches zum Einstellen in flüssige Luft gebraucht wird, ist erst mit Glaswolle und dann mit Schwefelsäure gefüllt. — Die Destillation wird in üblicher Weise bis auf 70° bis 80° C bei 10 bis 12 mm Druck mit der Wasserstrahlpumpe ausgeführt und dann mit der Geryk-Pumpe fortgesetzt. — Das Schwefelsäuregefäß wird in eine Kältemischung eingestellt. — Wir haben mehrere Destillationen auf diese Weise ausgeführt und einen Druck von 0,4 und öfters von 0,25 mm erreicht.

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 2158, 1902.

Über die Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren

13. Mitteilung.[1])

Über ein Verfahren zur Gewinnung der Purinbasen.

Von

P. A. Levene und John A. Mandel.

(From the Rockefeller Institute for Medical Research, New York and from the New York University and Bellevue Hospital Medical College, New York.)

(Eingegangen am 14. April 1908.)

Trotz des regen Interesses und der vielfachen Arbeit auf dem Gebiete der Nucleinchemie ist doch die Zusammensetzung der Nucleinsäuren bei weitem noch nicht aufgeklärt. Dieses ist dadurch verursacht, daß bis jetzt noch kein genaues Verfahren zur quantitativen Gewinnung der Komponenten der Nucleinsäure bekannt ist. Nur auf diese Weise erklären sich die großen Unterschiede in den Resultaten, die von verschiedenen Autoren erhalten wurden. Die Hauptschwierigkeit traf man bei der Darstellung der Purinbasen. Zwar wollte Steudel[2]) in der Salpetersäure neuerdings ein Mittel gefunden haben, welches eine genaue Erklärung der Nucleinsäurechemie ermöglichen sollte. Doch sind seine eigenen Erfahrungen bei der Analyse der Pyrimidinbasen solcher Art, daß man auf diese sich stützend die Salpetersäure nicht als ein hydrolisierendes Mittel empfehlen kann. Wir haben deshalb unsere Bemühungen um ein befriedigendes Verfahren zur Gewinnung der Purinbasen nicht aufgegeben, und sind endlich zu einer Methode gelangt, welche zu ziemlich reinen

---

[1]) Die früheren Mitteilungen s. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32** bis 50 und diese Zeitschr. **1**, 5 u. 9.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**, 406, 1906.

Präparaten ohne große Mühe führt. Nach unserer Erfahrung war die Schwierigkeit am größten, reines Guanin zu gewinnen. Das Rohguanin enthielt oft nicht mehr als 25 bis 30% Stickstoff. Das neue Verfahren erlaubt, gerade diese Substanz analysenrein nach zweimaligem Umkrystallisieren zu erhaltenen.

Die Spaltung wurde durch Essigsäure in Anwesenheit von Bleizucker ausgeführt. Die Ausbeute der Basen hängt von der Dauer der Erhitzung und von der Konzentration der Essigsäure ab. Am günstigsten erwiesen sich die folgenden Bedingungen: je 1,0 g Nucleinsäure wird mit 10 ccm 25% Lösung von Bleizucker und derselben Menge 25% Essigsäure etwa 4 Stunden im Autoklaven auf 150° erhitzt. Das Blei wird durch Schwefelsäure, die Essigsäure durch Destillation bei vermindertem Drucke entfernt und die Purinbasen mittels Silbersulfat gefällt. Die weitere Behandlung wird auf übliche Weise ausgeführt.

Das Guaninsulfat, welches nach zweimaligem Umkrystallisieren erhalten wurde, besaß die folgende Zusammensetzung.

0,2238 g der lufttrockenen Substanz verloren beim Erhitzen auf 130° C bei vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd an Gewicht 0.0179 g

für $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4 \cdot 2H_2O$.

	Berechnet:	Gefunden:
$H_2O =$	8,29%	8,00%.

0,1129 g der Substanz gaben 31,00 ccm Stickstoff (über 50% KOH) bei $t° = 17,5°$ und $p = 760$ mm

$(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4 \cdot H_2O$.	Berechnet:	Gefunden:
	$N =$ 32,26%	32,58%.

Das Rohprodukt bestand, wie man aus dem Stickstoffgehalt schließen darf, fast aus reinem Guanin.

0,1109 g der Substanz gaben 41,3 ccm Stickstoff bei $t = 20°$ und $p = 756$ mm

$C_5H_5N_5O$.	Berechnet:	Gefunden:
	$N =$ 46,53%	43,20%.

Was die Ausbeute an der Base betrifft, so muß man zwei Punkte in Betracht ziehen, nämlich die absolute Menge und das Verhältnis der zwei Purinbasen zueinander. Schon Kossel hat bei der Analyse der Thymus-Nucleinsäure bei der Spaltung

von 10,0 g Substanz 1,2 g Adenin und 0,6 g Guanin erhalten. Auf eine ähnliche Beobachtung sich stützend, ist Bang auf spekulativem Wege zur Annahme der Existenz einer Adeninguaninthyminsäure und einer zweiten Adenin-Cytosinsäure gekommen. Wie schon erwähnt, war auch nach unserer Erfahrung die Ausbeute an Adenin immer besser als an Guanin. Andere Forscher, Schmiedeberg, Osborn und Harris[1]), W. Jones[2]), haben immer die Anwesenheit von äquimolekularen Quantitäten von Guanin und Adenin im Molekül angenommen. Bei der Spaltung der Nucleinsäure mittels des Essigsäure-Bleiacetat-Verfahrens war die Ausbeute an den zwei Basen immer in annähernd äquimolekularen Verhältnissen. Die absolute Menge hing aber von den Bedingungen des Experimentes, wie man aus den folgenden Angaben schließen kann, ab.

Exp. 1. 15,0 g der lufttrockenen Substanz wurden mit 150 ccm 25% Bleiacetat und 150 ccm 10% Essigsäurelösung 4 Stunden am Rückflußkühler im Ölbade auf 150° C erhitzt. Es resultierte eine hellgelbe Lösung und ein beträchtlicher Niederschlag. Die Mischung wurde nun vom Blei mittels Schwefelsäure befreit, das Bleisulfat abfiltriert und zum Filtrate so lange eine Lösung von Silbersulfat zugefügt, bis bei weiterem Zusatze des Salzes sich kein Niederschlag mehr bildete. Der Niederschlag wurde auf übliche Art mittels Salzsäure zersetzt und die Purinbasen in bekannter Weise getrennt.

Die Ausbeute an Guanin betrug 1,0 g, die des Adeninpikrates 2,5 g.

Exp. 2. In einem zweiten Versuche wurden 15,0 g der Nucleinsäure wie im vorigen Experimente behandelt, aber nach den ersten vier Stunden in einen Autoklaven übertragen, und dann die Erhitung auf 175° C acht Stunden lang fortgesetzt.

Die Ausbeute an Rohguanin betrug 1,5 g, der Niederschlag löste sich aber nicht vollständig in verdünnter Schwefelsäure, es enthielt also etwas von einem melaninähnlichen Körper. Die Ausbeute an Guaninpikrat betrug 2,2 g.

Exp. 3. 30,0 g der Substanz waren mit 300 ccm Bleilösung und 300 ccm 10% Essigsäure wie oben im Ölbade bei

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 85, 1902.

[2]) W. Jones und Austrian, Journ. of Biolog. Chem. **3**, 1.

150° 4 Stunden lang erhitzt. Nun aber wurde der Inhalt des Kolbens mittels eines Luftstromes in beständiger Bewegung gehalten. Dabei verdunstete ein Teil der Lösung und man mußte von Zeit zu Zeit von der Essigsäurelösung zusetzen. Im übrigen war der Versuch wie die zwei ersteren ausgeführt. Die Ausbeute an Rohguanin, das sich vollkommen in verdünnter Schwefelsäure löste und beim Abkühlen sich als gut krystallinisches Sulfat abschied, betrug 2,5 g, die des Adeninpikrates 4,8 g.

Exp. 4. 15,0 g Nucleinsäure wurden mit Glasperlen innig vermischt und mit 150 ccm 25% Lösung von Bleizucker und 150 ccm einer 25% Essigsäurelösung 4 Stunden im Autoklaven auf 150° C erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde von Blei mittels Schwefelsäure befreit. Die Ausbeute an Rohguanin betrug 1,15 g, an Adeninpikrat 2,6 g.

Bei der Spaltung mittels 2% Schwefelsäure sind die Verhältnisse verschieden, wie das aus folgendem Experimente ersichtlich ist.

30,0 g der Nucleinsäure wurden mit 60 ccm 2% Schwefelsäure im Ölbade auf 150° C 4 Stunden mit Rückflußkühler erhitzt. Es resultierte eine dunkelbraune Flüssigkeit. Unlösliches Melanin war nicht viel zu bemerken. Die Purinbasen wurden mit Silbersulfat niedergeschlagen und auf übliche Weise untersucht. Die Ausbeute an Rohguanin betrug 3,5 g, an Adeninpikrat 6,0 g. Das Rohguanin enthielt aber nur 25% Stickstoff, und die Darstellung eines analysereinen Präparates war mit solchen Verlusten verbunden, daß man sich über den wirklichen Gehalt der Nucleinsäure an dieser Base keine Vorstellung machen konnte. Im Gegenteil war das Adeninpikrat von derselben Zusammensetzung wie das Rohpräparat, das man bei der Essigsäurebleispaltung erhielt. So enthielt ein Rohpikrat bei der Essigsäurespaltung 30% Sticktoff, bei der Schwefelsäurespaltung 28,6% Stickstoff.

Es scheint also nach den beigebrachten Experimenten, daß die Purinbasen wirklich in äquivalentem Verhältnisse im Moleküle der Nucleinsäure vorkommen. Nach einer älteren Arbeit von einem von uns[1]) scheint es, daß auch die Pyrimidinbasen

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 370, 1905.

in demselben Verhältnisse vorkommen. Nun bleibt es noch unentschieden, wie sich die Pyrimidin- zu den Purinbasen verhalten.

Nimmt man mit Steudel den gesamten Stickstoffgehalt der Nucleinsäure zu 15 an, dann dürfte man auch seine Ansicht über den relativen Gehalt an den Purin- und Pyrimidinbasen annehmen, und in diesem Falle würden die von uns gefundenen Zahlen ziemlich gut mit den von Steudel berechneten stimmen, wie das aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist. (Die Zahlen sind auf aschefreie Substanz berechnet. Die Nucleinsäure enthielt etwa 5% Asche und 5% Wasser.)

	Berechnet (Steudel[1]):	Gefunden (Levene u. Mandel):
Adenin	9,56	8,17
Guanin	10,72	9,15
Cytosin . . .	7,86	7,00
Thymin . . .	8,93	8,00

Der Betrag an Purinbasen ist dem, welchen W. Jones und Adrian[2]) bei der fermentativen Spaltung der Nucleinsäure erhalten haben, sehr ähnlich.

Nun aber ist es nicht ganz festgestellt, daß die reine Nucleinsäure nur 15% Stickstoff enthält, so waren z. B. die nach unserem Verfahren dargestellten Präparate oft viel reicher an Stickstoff. Wie aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist, gibt es Präparate mit 17% Stickstoff.

Präparat I. 0,1108 g Substanzen wurden für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet. Sie verlangten zum Neutralisieren 13,1 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4. N = 16,50.

0,3362 g Substanz gaben 0,1087 g $Mg_2P_2O_7$. P = 9%.

0,052 g hinterließen bei Verbrennung mit Calciumnitrat 0,0142 g Asche. (Eine Korrektur auf das zugesetzte Calciumsalz wurde ausgeführt.) Asche = 28,32% (phosphorfrei = 8,26%).

Präparat II. 0,1082 g der Substanz wurden für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl benutzt. Sie verlangten zur Neutralisierung 12,7 $^n/_{10}$-H_2SO_4. N = 16,43%.

0,2092 g der Substanz gaben 0,0706 g $Mg_2P_2O_7$. P = 9,39%.

0,0954 g der Substanz mit Calciumnitrat verascht, hinterließen 0,0263 g Asche = 27,67%. [P_2O_5 (frei = 6,17%].

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 49.

[2]) Journ. of Biolog. Chem. 8, 1.

Präparat III. 0,1262 g der Substanz wurden für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl gebraucht. Sie verlangten zum Neutralisieren 14,5 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4. N = 16,09 %.

0,1903 g der Substanz gaben 0,0616 $Mg_2P_2O_7$. P = 9.01 %.

0,0688 g der Substanz überließen 0,0216 g Asche = 31,39 % (P_2O_5-frei = 10,79).

Aschefrei berechnet hatten die Präparate die folgende Zusammensetzung:

	Präparat I:	Präparat II:	Präparat III:
N =	17,85 %	17,50 %	17,92 %
P =	9,74 %	10,00 %	10,08 %.

Es muß hier daran erinnert werden, daß alle Präparate durch Fällung mit wässeriger Salzsäure erhalten und nachher mit Wasser andauernd gewaschen waren. Daß die Präparate von Verunreinigungen ziemlich frei waren, darf man daraus schließen, daß sie bei der Veraschung eine ganz unbeträchtliche Menge Asche übrig ließen. So war es unmöglich, bei der auf übliche Weise ausgeführten Veraschung nicht mehr als etwa 10 % Asche zu erhalten, obwohl die Präparate über 9 % P enthielten, und es jedem, der sich mit der Nucleinsäureuntersuchung beschäftigt hat, bekannt ist, wie hartnäckig sie vorhandene anorganische Basen festhalten.

Man ist deswegen berechtigt, anzunehmen, daß der hohe Stickstoffgehalt den Nucleinsäuren wirklich zukommt. Es wäre sonst ganz sonderbar, daß der hohe Stickstoffgehalt, den einer von uns schon seit Jahren bei der Nucleinsäure beobachtet hat und welchen wir wiederholt fanden, immer durch Verunreinigung oder durch Analysenfehler verursacht sei.

Wenn sich die Befunde bezüglich der Stickstoffzahlen bestätigen, dann würde man die Ansicht von der Zusammensetzung der Nucleinsäure, wie sie durch die Formeln von Schmiedeberg und Steudel ausgedrückt sind, verändern müssen. Ein relativer Gehalt von 2 Pyrimidinbasen zu 3 Purinen würde besser dem Stickstoffgehalt 17 % entsprechen, als die Annahme von Steudel von dem äquimolekularen Gehalt in der Säure an Nucleinbasen. Wir hoffen auf diesen Gegenstand noch zurückzukommen.

Zur Chemie der Lebernucleoproteide.

Erste Mitteilung.

Über die Guanylsäure.

Von

P. A. Levene und John A. Mandel.

(From the Rockefeller Institute for Medical Research, New York and from the New York University and Bellevue Hospital Medical College, New York.)

(Eingegangen am 14. April 1908.)

Die Ansichten über der Guanylsäure, die seit ihrer Entstehung nur auf die experimentelle Arbeiten von Bang und seinen Mitarbeitern[1]) basierten, haben in einer verhältnismäßig kurzen Zeit mehrere Phasen erlebt.

Otto v. Fürth und E. Jerusalem[2]) haben zuerst die Existenz dieser Substanz ganz bezweifelt, sind aber jetzt geneigt, eine solche für die β-Guanylsäure zuzugeben; gleichzeitig ist Bang bereit, sich der Meinung von v. Fürth und Jerusalem anzuschließen, daß die α-Guanylsäure zu den Thymonucleinsäuren gehört. Auch Steudel[3]) nimmt die Existenz einer Guanylsäure in der Pankreasdrüse an. Die Guanylsäure soll aus dem ausgekochten Auszuge der Drüsen darstellbar sein, während der ausgekochte Rest der Drüse nur die Thymo-nucleinsäure liefern soll.

Nur schien uns auch trotz der Ergebnisse der neueren Forschungen die Stellung der Guanylsäuren zu den echten

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 133; **31**, 411. — Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 76. — Bang u. Raaschou, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 114.

[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **10** und **11**, 146.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **58**, 530.

Nucleinsäuren nicht ganz klar. Nach den Angaben von Bang sollen sie eine ganz nahe Verwandtschaft besitzen. Die α- und β-Guanylsäuren sollten sich aus denselben Bestandteilen der Drüse bilden, und die erste sollte ein Abbauprodukt der zweiten sein. Nach Steudel sollen diese zwei Substanzen von besonderen Bestandteilen der Drüse ihren Ursprung nehmen. Nun ist jetzt durch die Arbeiten von mehreren Forschern bekannt geworden, daß auch das Pankreasnucleoproteid nicht nur die üblichen Purin-, sondern auch die Pyrimidinbasen enthält, es sollte sich dann auch aus dem Nucleoproteide eine Thymonucleinsäure darstellen lassen, und in diesem Falle blieb die Urache der Bildung unter gewissen Bedingungen von Thymosäure, unter anderen von Guanylsäure, dunkel. Es ist aber wohl möglich, daß das Nucleoproteid aus mehreren Substanzen besteht.

Schon deswegen, und auch weil in der Kenntnis der chemischen Natur dieser Substanz viele Lücken vorhanden sind, haben wir die Untersuchung unternommen.

Nun ist aber die Arbeit mit der Pankreasdrüse im warmen Klima nicht sehr bequem, und wir wollten deswegen erforschen, ob die Substanz auch aus anderen Organen darstellbar ist. Das Nucleoproteid der Leber ist in seinem Pentosengehalt dem der Pankreasdrüse ähnlich, und es wurde deswegen ein Versuch gemacht, aus dieser Substanz Guanylsäure darzustellen. Es gelang wirklich eine Substanz zu gewinnen, die als β-Guanylsäure von Bang betrachtet werden könnte.

Die Darstellung der Substanz wurde auf folgendem Wege ausgeführt: Das Nucleoproteid wurde in 2%iger Kalilumhydratlösung über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann im kochenden Wasserbade eine halbe Stunde lang am Rückflußkühler erhitzt, die Lösung neutralisiert und in einem Apparate, der nach dem Prinzip des Faustschen Ofens konstruiert ist, bei 35° C bis auf ein ganz kleines Volumen eingeengt. Die Lösung mit dem sich schon bildenden Niederschlage wurde dann im Kühlraum bei 1° C über Nacht stehen gelassen. Es entstand dabei ein gelatinöser Niederschlag, der auf eine Nutsche übertragen und mittels einer Saugpumpe abfiltriert werden konnte. Dieser Niederschlag konnte dann durch wiederholtes Auflösen in heißem Wasser und Abkühlen auf 1° C gereinigt

werden. Man kommt aber viel rascher zum Ziele, wenn man die Lösung des ersten Niederschlages mit Ammoniak alkalisch macht, mit Alkohol fällt, und diesen Niederschlag wieder aus heißem Wasser durch Abkühlen ausfallen läßt. Der letzte Niederschlag wird auf einer Nutsche durch Seide mit einer Saugpumpe abfiltriert, mit eiskaltem 50%igem Alkohol (die Konzentration des Alkohols wird allmählich gesteigert), dann mit absolutem Alkohol und mit Äther gewaschen.

Die auf diese Weise erhaltene Präparate sind ganz weiß und geben keine Biuretreaktion.

Die Eigenschaften waren den von Bang für die β-Guanylsäure angegebenen ähnlich, aber nicht damit identisch. Die einmal eingetrocknete Substanz löste sich in heißem Wasser nicht mit derselben Leichtigkeit wie die frischbereitete Substanz. Sie ist aber leicht löslich in verdünnten Alkalien und Säuren. Mit ammoniakalischen Lösungen von Silbersalzen gab die Lösung der Substanz keine Fällung. Sie reduzierte Fehlingsche Lösung nicht. Wie aus den weiter beschriebenen Versuchen zu ersehen ist, besaß die Substanz eine ganz merkliche Resistenz gegen Behandlung mit verdünnten Alkalien und Säuren. Die Substanz ist optisch aktiv. 0,750 g der Substanz in 50 ccm einer 3%igen Schwefelsäure gelöst, drehte im 18,94 mm-Rohr + 0,20°.

Die Lösung wurde auf 150° C 4 Stunden lang im Ölbade am Rückflußkühler erhitzt, sie färbte sich dabei hellgelb und drehte in dem Rohre — 0,96°. Dieser Befund war sehr überraschend.

Die Zusammensetzung der Substanz war die folgende:

Präparat 1.

0,1605 g der Substanz gaben 0,1904 g CO_2 und 0,0633 g H_2O; C 32,35%; H 4,41%.

0,0936 g der Substanz, für Stickstoff nach Kjeldahl gebracht, verlangten zum Neutralisieren 11,1 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4; N = 16,60.

0,1537 g der Substanz gaben 0,0302 g $Mg_2P_2O_7$; P = 5,468.

0,0566 g der Substanz gaben 0,0132 g Asche, Asche 23,32%; Basen = 10,80.

Zwei andere Präparate hatten die folgende Zusammensetzung:

Präparat 2.

0,1300 g der Substanz für eine Stickstoffbestimmung nach

Kjeldahl verlangte zum Neutralisiern 12,5 $^n/_{10}$-H_2SO_4; N = 13,42 (aschefrei 16,9%).

0,3393 g der Substanz gaben 0,0702 $Mg_2P_2O_7$; P = 5,76%, aschefrei = 7,2%.

0,1537 gaben bei Verbrennung 0,0522 g Asche = 33,96%; frei von Phosphorsäure = 20,77%.

Präparat 3.

0,1724 g der Substanz wurden zu einer Kjeldahl-Stickstoffbestimmung benutzt. Es wurden 18,9 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 zum Neutralisieren verbraucht. N = 15,34.

0,4624 g der Substanz gaben 0,1023 $Mg_2P_2O_7$. P = 6,159.

0,2362 g der Substanz gaben 0,0744 g Asche phosphorfrei) = 16,96%.

Die Präparate waren also nicht ganz einheitlich. Die folgende Tabelle enthält einen Überblick über die Zahlen von Bang für die Präparate aus der Pankreasdrüse, und derjenigen, die bei der Analyse der vorliegenden Substanz erhalten wurden.

	Bang		Levene u. Mandel		
	β-Guanylsäure[1])	α-Guanylsäure[2])	I	II	III
C	34,28	—	36,35	—	
H	4,39	—	4,95	—	
N	18,21	15,38	18,65	16,9	18,47
P	7,64	6,65	6,15	7,2	7,4
O	34,48	—	33,90	—	

Abbau der Leberguanylsäure.

Nach kurzem Erhitzen der Substanz mittels mässig konzentrierten Mineralsäuren reduzierte sie Fehlingsche Lösung, es bildete sich der typisch weiße Niederschlag von Purinkupferoxydul und dabei ein bedeutender Niederschlag von rotem Kupferoxydul. Zur Untersuchung des Spaltungsproduktes der Säure wurden 15,0 der Substanz[3]) mittels 150 ccm einer 25%igen Bleizuckerlösung und 150 ccm 10%iger Essigsäure 4 Stunden lang am Rückflußkühler auf 150° C erhitzt. Nur ein Teil der Substanz ging in Lösung über. Das ganze Reaktionsprodukt

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 133.

[2]) Bang u. Raaschou, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 111, 128, 1904.

[3]) Enthielt 20% Asche und 13,42% P.

wurde vom Blei mittels Schwefelsäure befreit. Es wurde ein Überschuß der Säure vermieden. Zur vollständigen Trennung des Bleisulfates wurde die Lösung erhitzt und heiß filtriert. Beim Abkühlen der Lösung bildete sich ein gelatinöser Niederschlag, welcher beim Erwärmen sich wieder auflöste. Ganz unerwartet zeigte es sich, daß die Lösung weder Fehlingsche Lösung reduzierte, noch ein Niederschlag von Purinkupferoxydul sich bildete. Es war also keine nennenswerte Spaltung verursacht. Um diese zu behaupten, wurde die vom Blei befreite Lösung wieder 4 Stunden im Ölbade auf 150° C am Rückflußkühler erhitzt, aber hiernach war nur eine ganz unbedeutende Spaltung erreicht. Zu der Lösung wurde dann Salzsäure bis zu einem Gehalt von 1% zugegeben, und die Lösung wieder auf 150° C 5 Stunden im Ölbade am Rückflußkühler erhitzt. Nach dieser Behandlung reduzierte das Reaktionsprodukt Fehlingsche Lösung und gab einen Niederschlag von Purinkupferoxydul. Die Lösung drehte jetzt die Ebene des polarisierten Lichtes nach links. Die Hydrolyse wurde deswegen als beendet betrachtet. Die Lösung wurde jetzt mittels Silbersulfat in 2 Fraktionen getrennt, nämlich in einen Niederschlag, der aus Silberpurinen bestand, und dem Filtrate davon.

Purinfraktion.

Der Niederschlag bestand aus Silberpurin und aus dem überschüssigen Silbersulfat. Es wurde mit Salzsäure genau vom Silber befreit, und aus dem heißen Filtrate krystallisierte Guaninsulfat in langen farblosen Nadeln. Die Ausbeute an lufttrockener Substanz betrug 2,7 g.

0,1351 g der Substanz gaben 0,1376 g CO_2 und 0,0580 g H_2O.

$(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4 + 2H_2O$,	berechnet	gefunden
	C = 27,65	27,73
	H = 3,68	3,78

Das Filtrat vom krystallinischen Guaninsulfat wurde mit Ammoniak neutralisiert und eingedampft. Es schied sich dabei ein Niederschlag aus, der 0,400 g betrug, und welcher sich wieder in Sulfat überführen ließ. Es gab die Farbenreaktion des

Guanins. Aus dem Filtrat hiervon war es unmöglich, Adeninpikrat zu gewinnen.

Pyrimidinbasen.

Ein Versuch die Pyrimidinbasen aus der Guanylsäure zu gewinnen, hatte einen doppelten Zweck. Erstens sind in der Zeit nach der Arbeit Bangs über die Zusammensetzung der Pankreasguanylsäure die Kenntnisse über den Pyrimidingehalt andersartiger Nucleinsäuren viel erweitert, und die verbesserten Methoden zur Gewinnung der Basen wurden auf die Guanylsäure bisher nicht angewandt. Wenn es zweitens nicht gelingen sollte, Cytosin aus dieser Säure zu gewinnen, würde das allein ein Beweis gegen die Ansicht Burians vom sekundären Ursprung dieser Substanz in anderen Nucleinsäuren sein. Zu diesem Zwecke wurden 11,0 g der Guanylsäue mit 50 ccm 25%iger Schwefelsäure im Autoklaven auf 175° C erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde dann mit Äther ausgezogen und die wässerige Lösung von überschüssiger Schwefelsäure befreit und zur Ausscheidung des Thymins sich überlassen. Es war aber keine solche Ausscheidung wahrzunehmen. Die Schwefelsäure wurde nun quantitativ entfernt und eine Probe des Filtrates mittels Pikrinsäure behandelt. Es bildete sich dabei ein amorphes Pikrat, welches sich beim Auflösen in ölartiger Form ausscheidet, also nicht Cytosinpikrat war. Mit wässeriger Pikrolonsäure wurde ein Niederschlag erhalten, der sich viel besser reinigen ließ. Nur 0,030 g dieses Pikrolonates ließen sich gewinnen.

Es besaß die folgende Zusammensetzung:

0,031 g der Substanz gaben 0,0549 CO_2 und 0,0170 g H_2O für $C_4H_4N_2O.C_{10}H_8N_4O_5$.

	Berechnet	Gefunden
C =	44,92	48,29
H =	3,21	6,13

Es kommen also in der Guanylsäure die üblichen Pyrimidinbasen nicht vor. Dieses erbringt einen neuen Beweis für den primären Ursprung dieser Substanzen im Moleküle der Thymonucleinsäure.

Über die Kohlehydratgruppe der Leberguanylsäure.

Bei der Betrachtung der Natur des Zuckers der Pankreasguanylsäure schließt sich Bang auf Grund der schönen Unter-

suchungen von Neuberg über die Pancreasdrüse der Ansicht an, das er l-Xylose ist. Wie man es jetzt annehmen darf, ist das übliche Nucleoproteid wahrscheinlich eine Mischung von mehreren Nucleoproteiden und von Mucoid; es würde sich deshalb empfehlen, über die Natur des Zuckers in der Nucleinsäure selbst an der Guanylsäure unmittelbar zu forschen. Es stellen sich dabei Schwierigkeiten heraus, größere Quantitäten der Substanz aus Leber zu gewinnen, und wir haben deshalb die Untersuchungen in dieser Richtung nicht ganz abschließen können. Die Deutung einiger Befunde schien noch nicht ganz klar. Es wurde schon erwähnt, daß die Substanz vor der Spaltung rechtsdrehend und das Hydrolyseprodukt linksdrehend war.

Hexosen kommen in der Guanylsäure nicht vor. Der Ätherauszug der Spaltungsprodukte, welche zur Analyse der Pyrimidinbasen gebraucht waren, ließ keine Lävulinsäure beim Verdunsten zurück.

Zur genaueren Untersuchung des Kohlenhydrates wurde das Filtrat von den Silberpurinen gebraucht. Dieses Filtrat enthielt nur 0,200 mg Stickstoff (dieses ist ein guter Beweis, daß mittels Silbersulfat alle Purine entfernt waren). Das Volumen des silberfreien Filtrates betrug 140,0 ccm, von diesen wurden 60,0 ccm zur quantitativen Bestimmung des Zuckers und zur Darstellung des Osazons angewandt.

1,0 ccm der Lösung reduzierten 0,01394 g Kupfer. (Die Bestimmung wurde durch Titration des Kupferoxyduls mittels Cyankalium ausgeführt.)

Um den Befund zu kontrollieren, wurden in einem zweiten Versuche 0,740 g der Substanz mit 50 ccm 2% H_2SO_4 im Ölbade auf 150° C 4 Stunden lang erhitzt, die Purinbasen mittels Silbersulfat entfernt und das Reduktionsvermögen wie oben bestimmt. Die Lösung betrug 280 ccm.

12 ccm reduzierten 0,00531 g Kupfer.

Aus diesen Befunden läßt sich berechnen:

	Exp. 1	Exp. 2
Arabinose	8,5%	7,65%
Xylose	6,45%	5,40%

Eine Furfurolbestimmung, nach Angaben von Grund ausgeführt, gab die folgenden Zahlen:

0,4192 g der Substanz gaben 0,0904 g des Phloroglucides.

Daraus berechnet sich für l-Xylose 20,64%, für l-Arabinose 24,34%.

Allem Anschein war die Spaltung in keinem von diesen Versuchen zu Ende gebracht. Über den annähernden Gehalt der Substanz an Kohlenhydrat darf man deshalb nur die Furfurolbestimmungen in Betracht ziehen. Zur genaueren Untersuchung der Natur der Pentose konnte bei dem Mangel an Material nur noch auf das Osazon Rücksicht genommen werden. Das Osazon ließ sich aus verdünntem Alkohol umkrystallisieren; es war darin ziemlich löslich, so daß das Umkrystallisieren nur zweimal wiederholt wurde. Der Schmelzpunkt lag beim raschen Erhitzen bei 159 bis 160° C.

Zur Bestimmung des optischen Verhaltens der Substanz mußten 0,150 g der Substanz erst in 6 ccm Alkohol und 4 ccm Pyridin (nach Neuberg) gelöst, bis auf 30 ccm verdünnt werden. Dabei konnte man eine nur schwer ablesbare Rotation nach links (—0,05°) wahrnehmen. Dieses würde auf das Vorliegen von l-Xylose hindeuten; wir halten aber diese Frage für noch nicht ganz entschieden.

Glycerin.

Die 80 ccm der Lösung, welche nach der Zuckerbestimmung übrig geblieben waren, wurden in 2 Teile, zu je 40 ccm geteilt. Eine Portion wurde in üblicher Weise für die Borsäure-Acroleinprobe gebraucht, aber mit negativem Resultate; die zweite wurde im Apparate mit Jodwasserstoffsäure erhitzt, es war aber keine Isopropyljodidbildung nachzuweisen.

Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente.

7. Mitteilung.[1])

Über den Nachweis des Trypsins.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 16. April 1908.)

Da neuerdings erhöhtes Interesse für Trypsin-Bestimmungsmethoden zu erkennen ist,[2]) möchte ich auf einige Erfahrungen, die ich in den letzten Jahren gesammelt habe, hier hinweisen.

I. In derselben Arbeit,[3]) in welcher ich die Pepsinbestimmung durch Ricinaufhellung ausführlich beschrieben habe, erwähnte ich bereits, daß auch durch Trypsin das Ricin aufgehellt wird. Da es sich bisher beim Trypsin nicht um praktische Bedürfnisse größeren Umfanges handelt, habe ich mich nicht bemüht, hier Vereinfachungen durchzuführen.

Für die Trypsinbestimmungen benutze ich Merckscher

---

[1]) Die früheren Mitteilungen finden sich in dieser Zeitschr. **1** bis 8.

[2]) Groß, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **58**, 1907.

[3]) Diese Zeitschr. **1**, 71, 1906. — Die Pepsin-Rizinmethode ist nicht nur in den schwerzugänglichen „Arbeiten des Pathologischen Instituts", wie einige Autoren anzunehmen scheinen, sondern ausführlich in dieser Zeitschrift Bd. **1** veröffentlicht. — Das Bedenken von Groß (Berl. klin. Wochenschr. **1908**, Nr. 13), die Ausführung der Methode nach den Vorschriften von Solms (Zeitschr. f. klin. Med. **64**, 1907), wäre für die Praxis zu teuer, kann ich nicht teilen; die vollkommene Pepsinuntersuchung eines Magensaftes verursacht nur 2—3 Pfennig Kosten, da sie mit dem billigen Ricin der Vereinigten Chemischen Werke Charlottenburg ausgeführt wird.

Ricin, von dem ich wie für die ursprünglichen Pepsinprüfungen 1 g in 100 ccm $1^1/_2$ %iger Kochsalzlösung löse.

Versuch: In eine Reihe von Röhrchen kommt zunächst 2 ccm der eben beschriebenen Ricinlösung, ferner

0 — 0,1 — 0,2 — 0,3 — 0,5 — 0,7 — 1,0

einer 1%igen Lösung von Grüblers Trypsin. Mit Wasser wird auf 3 ccm aufgefüllt und überall 0,5 ccm Soda (1%) zugesetzt.

Das Röhrchen ohne Trypsin bleibt dauernd trübe, die übrigen hellen sich allmählich auf, das mit 0,1 Trypsin ist nach 6 Stunden Aufenthalt im Brutschrank ganz klar.

II. In einer bestimmten Anordnung war es mir auch möglich, mit Hilfe von Edestin Trypsinprüfungen durch Aufhellung vorzunehmen. Meinen ursprünglichen Plan, für den Pepsinnachweis das Edestin zu benutzen, hatte ich, wie früher ausgeführt wurde, nicht weiter verfolgt, weil das Edestin mir wegen seiner Löslichkeit in Säuren nicht bequem war. In Alkalein löst sich Edestin ebenfalls. Trotzdem kann man Trypsinprüfungen durch Aufhellung damit vornehmen. Man muß nur etwas mehr Edestin anwenden, ohne die Alkalimenge zu vermehren. Das ist möglich, da die Soda nur zum Trypsin im richtigen Verhältnis stehen muß.

Versuch: In 3 Röhrchen wird je 5 ccm einer 0,2%igen, unfiltrierten Edestinaufschwemmung, 0,5 ccm Soda (1%) getan, dann

0 — 0,1 — 1,0 ccm Trypsin Grübler (1%)
1,0 — 0,9 — 0 ccm Aqua dest.

Nach drei Stunden Aufenthalt im Brutschrank steht bei der Probe ohne Trypsin über einem Bodensatz trübe Flüssigkeit, die beiden anderen Proben haben nur einen Bodensatz, während die überstehende Flüssigkeit klar ist.

Auch die Probe ohne Trypsin kann sich im Brutschrank klären, bei Zimmertemperatur tritt aber dann im Gegensatz zu den Trypsinproben nachträglich wieder die Trübung auf.

III. Wie ich bereits früher erwähnt habe,[1]) eignet sich auch gekochtes Serum zum Trypsinnachweis. Als Bestimmungsmethode ist es aber nicht zu empfehlen, weil sich, wie ich in

[1]) Diese Zeitschr. **2**, 147, 1906.

der nächsten Mitteilung zeige, eigenartige Reaktionen an die zunächst eintretende Aufhellung anschließen.

Von den von mir geprüften Methoden dürfte also die erste die zweckmäßigste sein. Zum Beispiel ist sie ausgezeichnet brauchbar, um ein Antifermentserum zu prüfen, sofern es sich um einigermaßen klare Sera handelt. Man gelangt dabei zu sehr genauen Resultaten. Von früheren Methoden hat mir für manche Zwecke die Methode von Fermi gute Dienste geleistet.

Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente.

8. Mitteilung.

Über die Einwirkung von Trypsin auf Serum.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 16. April 1908.)

Vor anderthalb Jahren veröffentlichte ich folgende Beobachtung[1]): „Setzte man zu trübem (d. h. mit Wasser auf das Dreifache verdünntem und aufgekochtem) Rinderserum gleiche Mengen Salzsäure und Wasser, aber steigende Pepsinmengen, so werden die Proben mit dem größten Pepsingehalt zuerst geklärt, allmählich folgen die andern. Die Klärung bleibt aber nicht dauernd bestehen, vielmehr beginnen zunächst die zuerst geklärten Proben sich wieder zu trüben, dann mit der Zeit nach und nach die übrigen. Kocht man die wasserklaren Proben in dem Stadium der Klärung auf, so bleiben sie dauernd klar, die wieder getrübten geben in der Siedehitze ein dickes Koagulat, während die Proben ohne Ferment, die nur Säure enthalten, durch Erhitzen zum Teil geklärt werden."

Bei der Fortsetzung der Versuche schien es mir wünschenswert, den Einfluß der Antifermente auf die merkwürdige Reaktion zu prüfen. Beim Pepsin ist nun bekanntlich die Anwendung der Antifermente mit Schwierigkeiten verbunden, und ich untersuchte daher, ob man auch mit Trypsin ähnliche Beobachtungen machen kann. Das ist in der Tat der Fall.

---

[1]) Diese Zeitschr. **2**, 147, 1906.

Versuch: In gefrorenem Zustande aufbewahrtes Pferdeserum wurde nach dem Auftauen mit der doppelten Menge destillierten Wassers gemischt, zum Sieden erhitzt und einige Zeit im Sieden erhalten. Unterbricht man die Erhitzung zu früh, so erhält man weniger trübe Flüssigkeiten. Nach dem Abkühlen wird die trübe Flüssigkeit mit Chloroform gesättigt und im Eisschrank aufgehoben. Als Trypsin wurde Grüblers Trypsin benutzt, von dem für jeden Versuch eine frische 1%ige Lösung hergestellt wurde.

In je 3 Röhrchen kommen in Kubikzentimeter

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Trypsin (1%)	0	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Dest. Wasser	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0

Zu allen Proben kommt je 0,5 Soda (1%) und 2 ccm des trüben Pferdeserums.

Je ein Röhrchen Nr. 1 bis 7 werden sofort aufgekocht. Sie bleiben dauernd gleichmäßig trübe, Nr. 1 ist eine Spur weniger trübe als die übrigen.

Je zwei Röhrchen Nr. 1 bis 7 werden verkorkt und in den Brutschrank getan.

Nach etwa 1½ Stunden sind außer Nr. 1, das ganz trüb bleibt, die übrigen Proben (2 bis 7) klar und durchsichtig.

Wiederum wird nun je eine Probe 1 bis 7 aufgekocht. Dabei bleibt die Probe 1 trübe, die anderen 2 bis 7 klar.

Die einmal aufgekochten Proben bleiben innerhalb 24 Stunden sowohl im Brutschrank wie bei Zimmertemperatur unverändert.

Die dritten Proben 1 bis 7 bleiben 22 Stunden im Brutschrank.

Nunmehr ist

Nr. 1 unverändert dick-trübe, nach dem Aufkochen etwas weniger trübe,
Nr. 2 wenig gleichmäßig trübe „ „ „ fast klar,
Nr. 3 { ein unbedeutender Niederschlag in der klaren Flüssigkeit „ „ „ ganz klar,

Nr. 4 } stärkerer Niederschlag
Nr. 5 } in der klaren Flüssigkeit } nach dem Aufkochen { deutlicher Niederschlag
Nr. 6 } noch größererNiederschlag
Nr. 7 } in der klaren Flüssigkeit } „ „ „ starker Niederschlag

Ganz wie ich es beim Pepsin beschrieben habe, hellt also Trypsin, wie bereits früher von mir erwähnt wurde, trübes Serum zunächst vollkommen auf, so daß auch beim Aufkochen die Lösung klar bleibt. Beobachtet man — bei Ausschluß von Verdunstung und unter antiseptischen Kautelen — die Proben noch eine Anzahl Stunden länger, so werden sie wieder trübe, Niederschläge setzen sich ab, die auch beim Kochen bestehen bleiben. Dieser Vorgang tritt um so beschleunigter ein, je mehr Trypsin vorhanden ist.

Da meine Beobachtungen wahrscheinlich mit Danilewskis Plasteinreaktion etwas zu tun haben, habe ich in der Literatur Angaben über die Plasteinreaktion mit Trypsin gesucht und bei Lawrow[1]) folgendes gefunden: „W. Okunew (Wratsch, 1900, S. 682, russisch) weist darauf hin, daß im Pankreassafte der Pflanzenfresser und Hunde sich ein Labferment befindet, das ‚Peptonlösungen' nicht bei saurer, sondern alkalischer Reaktion, z. B. bei Gegenwart 0,5 bis 1% kohlensaures Natron zur Koagulation bringe."

Fügt man zu wirksamen Trypsinproben am Beginn des Versuchs antitryptisch wirksames, normales Pferdeserum, so verzögert sich, resp. unterbleibt die Aufhellung, und auch die nachträgliche Trübung findet nicht statt.

Versuch: Als Antitrypsinserum wird Pferdeserum benutzt, das in gefrorenem Zustande aufbewahrt war.

In je 4 Röhrchen kommt in Kubikzentimeter:

	1.	2.	3.	4.
Antifermentserum	0	0,1	0,2	0,3
0,85%ige Kochsalzlösung	0,3	0,2	0,1	0

Darauf kommt in alle Proben je 1 ccm Trypsin (1%), 0,5 ccm Soda (1%) und 2 ccm trüben Serums.

Eine Reihe 1 bis 4 wird sofort aufgekocht; alle Proben

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 1907.

bleiben trübe, die Trübung ist desto dicker, je höher der Serumgehalt.

Die zweite Reihe 1 bis 4 wird aufgekocht, nachdem 1 im Brutschrank sich geklärt hat. 1 bleibt klar, 2 ist vor und nach dem Kochen etwas trübe, 3 mehr, 4 am meisten.

Die dritte Reihe wird 22 Stunden im Brutschrank belassen.

Nunmehr enthält 1 einen Niederschlag, der beim Kochen zunimmt, 2 ebenfalls einen Niederschlag, der nach dem Erhitzen stärker als bei 1 ist, 3 nur eine Spur Niederschlag, der beim Kochen einer gleichmäßigen Trübung Platz macht. 4 ist vor und nach dem Kochen nur trübe.

Die vierte Reihe verbleibt ebenfalls 22 Stunden im Brutschrank.

Sodann wird zu 1 0,3, zu 2 0,2, zu 3 0,1 ccm Antifermentserum zugefügt. Die Proben entsprechen vor dem Erhitzen den parallelen Proben der dritten Reihe. Nach dem Erhitzen hat 1 einen starken Niederschlag, 2 einen noch stärkeren, während 3 nur ein Spürchen Niederschlag zeigt und 4 gleichmäßig trübe ist.

Setzt man Normalserum erst nach eingeleiteter Verdauung zu, so kann man verschiedenes beobachten. Zumeist wird der Prozeß noch aufgehalten resp. verhindert, so daß es nicht zur Niederschlagsbildung kommt. Mehrfach habe ich mich jedoch davon überzeugt, daß in einem Stadium, in dem die Niederschlagsbildung noch nicht eingetreten ist, das Normalserum nicht mehr imstande ist, den Prozeß dauernd zu verhindern.

Es muß nun versucht werden, den Anteil der Fermente und Antifermente an der Reaktion mit Hilfe chemischer Methoden festzustellen. Dabei wird auch zu prüfen sein, inwiefern die Beobachtungen zu den interessanten Feststellungen von Beitzke und Neuberg[1]) über den Einfluß der Antifermente auf die Synthesen, die durch Tierversuche von Hildebrandt[2]) ergänzt wurden, sich in Beziehung bringen lassen. Auch die Angabe von R. O. Herzog[3]), daß die Zunahme der Viscosität von Verdauungsgemischen, die unter dem Einfluß von Trypsin stattfindet, durch Zufügung von Ascarispreßsaft gehemmt wird, sei hier ausdrücklich erwähnt.

Die Versuche werden fortgesetzt.

[1]) Virchows Archiv **183**, 169, 1906.
[2]) Virchows Archiv **184**, Heft 3, 1906.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, Heft 3 u. 4, 1903.

Bemerkungen zu den Arbeiten von Aron u. Sebauer: „Untersuchungen über die Bedeutung der Kalksalze usw.“[1]) und von Aron und Frese: Die Verwertbarkeit verschiedener Formen des Nahrungskalkes usw.“[2])

Von

Arnold Orgler.

(Eingegangen am 18. April 1908.)

Aron und seine Mitarbeiter ziehen aus der Tatsache, daß der Säugetier-Organismus im Mittel ca. 1,2% CaO enthält, den Schluß, daß auch zum Aufbau von 100 g normal zusammengesetzter Körpersubstanz immer der Ansatz von ca. 1,2 g CaO nötig ist. Da die Autoren diesen Wert als Maßstab für die Beurteilung des Kalkstoffwechsels überhaupt hinstellen und da es in der Tat von Bedeutung wäre, wenn wir eine feste Norm für den Kalkansatz besäßen, lohnt es sich wohl der Mühe, nachzusehen, ob die Aufstellung dieses Quotienten auf Grund der Versuche Arons und seiner Mitarbeiter berechtigt ist. Voraussetzung ist natürlich bei dieser Berechnung, wie Aron und Frese richtig hervorheben, daß der Organismus bei hinreichender Zufuhr stets gleichartige Körpersubstanzen aufbaut. „Steht genug CaO zur Verfügung, so kann man fordern, daß auf eine bestimmte Menge neugebildeter Körpersubstanz, wie sie sich in der Gewichtszunahme ausdrückt, stets eine bestimmte gleichbleibende Menge CaO zurückbehalten wird „(Aron und Frese S. 199). Leider sind Versuche, bei denen diejenige Menge Kalk gereicht wurde, die pro 100 g Körperzuwachs einen Ansatz von 1,2 g CaO bewirkte, von den Autoren nicht angestellt worden. Wie ist es nun, wenn ein Überschuß von Kalk dem Organis-

[1]) Diese Zeitschrift 8, 1, 1908.

[2]) Diese Zeitschrift 9, 185, 1908.

mus zugeführt wird? Aron und Frese entscheiden sich dahin, daß in diesem Falle nur diejenige Kalkmenge retiniert wird, die dem Körpergewichtszuwachs entspricht; das geht ganz klar aus dem auf Seite 192 angeführten Beispiel hervor. Dem widersprechen aber die Versuche von Aron und Sebauer.

Von den mit kalkreicher Kost gefütterten Tieren retiniert Tier IV statt eines durch den Körpergewichtszuwachs verlangten Ansatzes von 50,2 g CaO 73,7 g CaO, also 50% mehr Tier V statt eines Bedarfes von 14,2 g CaO sogar 46,4 g CaO,[1]) also mehr als das Zweifache des Bedarfes. Aus dieser Tatsache folgt ohne weiteres, daß bei reichlichem Kalkangebot der Organismus mehr Kalk ansetzt als dem berechneten Bedarf entspricht, daß also Körpergewichtszunahme und Kalkansatz nicht einander parallel gehen, wie es die Aronsche Berechnungsweise fordert. Schwieriger zu beurteilen sind die Verhältnisse bei der Unterernährung mit Kalk. Dabei kommen folgende Möglichkeiten in Betracht: Entweder wächst der Organismus weniger stark, immer nur entsprechend der geringeren Kalkmenge, die ihm zur Verfügung steht, so daß stets auf 100 g Zuwachs 1,2 g CaO kommen, oder er nimmt an Gewicht gleichmäßig zu, verändert aber dabei seine chemische Zusammensetzung, indem er entweder kalkärmere Gewebe in höherem Maße ansetzt oder bei gleichartig zusammengesetztem Wachstum statt des Kalkes andere Substanzen in den kalkbedürftigen Geweben ablagert. Aus dem Versuche von Aron und Sebauer geht zur Beantwortung dieser Möglichkeiten folgendes hervor:

1. Die kalkarm ernährten Tiere blieben teilweise im Wachstum zurück (so die Hunde der III. Versuchsreihe, namentlich Tier II).

2. Wie aus den Sektionsprotokollen der Hunde der II. Versuchsserie hervorgeht, wird weniger Muskel und anscheinend mehr Fett gebildet, worauf schon Geheimrat Zuntz die Autoren aufmerksam macht.

3. Das Gewicht der Knochen der kalkarm genährten Tiere differiert nicht von den der kalkreich ernährten, statt Kalk ist aber Wasser in den Knochen abgelagert.

---

[1]) Die in der Arbeit angegebene Zahl 31,0 beruht auf einem Rechenfehler, da 60% von 77,4 g CaO der Zufuhr nicht 31,0 sondern 46,4 g CaO-Ansatz ergibt.

Kämen nur Punkt 1 und Punkt 3 in Betracht, so stände der von Aron angestellten Berechnung nichts im Wege. Dagegen wird die Berechnung fehlerhaft, sobald es sich zeigt, daß bei kalkarmer Ernährung von einem Gewebe (Muskel) weniger und von einem anderen (Fett) mehr gebildet wird als bei kalkreicher Ernährung; denn dann besteht nicht mehr die gleichartige Zusammensetzung des Anwuchses, welche die Voraussetzung für die Aronsche Berechnung ist. Leider liegen keine Gesamtanalysen der Tiere vor, aus denen man einen zwingenden Schluß nach der einen oder anderen der Richtung ziehen könnte. Dagegen kann man zur Beantwortung der Frage, ob überhaupt bei wachsenden Tieren der Körpergewichtszuwachs stets in derselben Weise vor sich geht, die Versuche von Aron und Frese heranziehen. Die beiden Versuchstiere bekamen drei Wochen lang ein Futter, das für jedes Tier ungefähr denselben Calorien-, Stickstoff- und Kalkgehalt aufwies. Der Kalkgehalt der Nahrung war derart bemessen, daß die Tiere nur 50 bis 60% des aus dem Körpergewichtszuwachs berechneten Bedarfes ansetzten (s. Tabelle IV der Arbeit); es bestand also eine erhebliche Unterernährung mit Kalk. Geschieht nun der Anwuchs derart, daß stets gleichartige Körpersubstanzen aufgebaut werden — und nur, wenn dies der Fall ist, hat die Aronsche Berechnung einen Wert —, dann müßten sowohl beide Tiere pro 100 g Zuwachs denselben Stickstoff- und Kalkansatz aufweisen, als auch müßte bei jedem Tier in der einzelnen Periode das Verhältnis N : CaO stets dasselbe bleiben. Berechnet man nun aus den Stoffwechselversuchen diese Zahlen, so ergibt sich folgende Tabelle:

Periode	Pro 100 g Zunahme werden angesetzt				N : CaO (CaO = 1)	
	Tier I		Tier II			
	N	CaO	N	CaO	Tier I	Tier II
1. Anorganisches Ca .	3,8 g	0,730 g	5,2 g	0,572 g	5,15 g	9,08 g
2. Rohe Milch	3,2 g	0,615 g	4,6 g	0,519 g	5,19 g	8,83 g
3. Sterilisierte Milch .	2,9 g	0,686 g	3,6 g	0,636 g	4,32 g	5,67 g
Alle drei Perioden zusammen	9,9 g	2,031 g	13,4 g	1,727 g		
Im Durchschnitt . . .	3,3 g	0,677 g	4,5 g	0,576 g		

Bei der Verwertung dieser Tabelle muß berücksichtigt werden, daß in der Periode mit anorganischem Kalk ein anderes Futter verwendet wurde als in den Milchperioden. Doch ist dies ohne Einfluß auf das Ergebnis; denn die hauptsächlichsten Differenzen finden sich gerade bei Vergleich der beiden Milchperioden miteinander. Ein Blick auf die Tabelle zeigt, daß die Stickstoffretention pro 100 g Zuwachs sowohl bei beiden Tieren ganz verschieden war, als auch bei jedem Tier, namentlich bei Tier II, in den einzelnen Perioden erhebliche Differenzen erkennen läßt; auch der Kalkansalz ist bei beiden Tieren verschieden, sowohl in den einzelnen Perioden, als auch beim Vergleich beider Tiere miteinander, und dementsprechend zeigte auch das Verhältnis N : CaO, vor allen Dingen bei Tier II, ganz beträchtliche Unterschiede. Daraus folgt, daß Tier II einen anderen, und zwar stickstoffreicheren und kalkärmeren Anwuchs hatte als Tier I. Noch auffallender wird diese Tatsache dadurch, daß Tier I pro Periode ca. 1000 Calorien und ca. 30 g N mehr bekam als Tier II. Trotzdem retiniert Tier II in den 3 Perioden ca. 8,7 g N mehr als Tier I. Nun könnte man dies vielleicht verstehen, wenn auch der Kalkansatz bei Tier II besser wäre als bei Tier I. Dem ist aber nicht so, da, wie aus Tabelle III der Arbeit hervorgeht, Tier II relativ weniger retiniert als Tier I.[1]) Aus alledem folgt, daß bei diesen Tieren der Körpergewichtszuwachs sich ganz verschieden zusammensetzen muß, sowohl in den einzelnen Perioden eines jeden Versuches (namentlich bei Tier II), als auch beim Vergleich beider Tiere untereinander. Der Körpergewichtszuwachs verläuft also nicht gleichartig, wie Aron annimmt; damit fällt aber auch diejenige Voraussetzung, auf der die Aronsche Berechnung basiert. So wertvoll auch die tatsächlichen Ergebnisse der Arbeiten von Aron und seinen Mitarbeitern sind, so geht aus ihnen absolut nicht hervor, daß die von Aron eingeführte Berechnung des Kalkbedarfes berechtigt ist; vielmehr muß vorläufig an der bisher üblichen und auch von Albu und Neuberg[2]) übernommenen Berechnungsweise festgehalten werden.

[1]) Die absolut retinierten Werte können schlechter berücksichtigt werden, da Tier I mehr Kalk bekam als Tier II und daher mehr CaO zurückbehält; beim Stickstoff dagegen ist es umgekehrt.

[2]) Physiologie u. Pathologie des Universalstoffwechsels. Berlin 1906, Julius Springer, S. 111.

Atoxyl- und Anilinvergiftung.

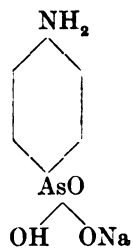
Von

Ferd. Blumenthal und Friedrich Herschmann.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 17. April 1908.)

Seitdem das Atoxyl im Jahre 1902 von dem einen von uns (Bl.[1]) für die therapeutische Anwendung empfohlen wurde, sind mit diesem Mittel wiederholt Vergiftungserscheinungen beobachtet worden, welche infolge der Konstitution dieses Arsenpräparats von einzelnen Autoren als Arsenvergiftung, von anderen als Anilinvergiftung betrachtet wurden. Die zuerst für das Atoxyl aufgestellte Formel ließ dasselbe als Metaarsensäureanilid erscheinen, und es war deshalb sehr naheliegend, anzunehmen, daß im Organismus daraus Anilin gebildet werden könnte. Die schönen Untersuchungen von Ehrlich und Bertheim[2]) ergaben nun aber, daß das Atoxyl p-amidophenylarsinsaures Natrium ist.



Nach dieser Formel ist eine Anilinvergiftung im Körper schon weniger wahrscheinlich, da Ehrlich und Bertheim aus

[1]) Med. Woche **1902**, Nr. 15.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 3293, 1907.

Atoxyl nur unter hohem Drucke Anilin gewinnen konnten. Allerdings ist dies noch kein Beweis, da der Organismus imstande ist, Prozesse auszuführen, welche in der Retorte nicht oder nur sehr schwer gelingen.

Schon in seiner ersten Veröffentlichung hat der eine von uns (Bl.) auf Grund eines Versuches am Hunde mitgeteilt, daß er es nicht für wahrscheinlich hielte, daß wesentliche Mengen von Anilin nach der Atoxylinjektion gebildet würden, wenigstens nicht solche Mengen, die zu einer Vergiftung führen könnten. Beim mit Atoxyl vergifteten Hunde ebenso wie beim Kaninchen konnten nur hämorrhagische Entzündungen und reine Hämorrhagien, insbesondere in der Niere, aber auch in der Blase festgestellt werden, seltener im Darm und in der Leber. Es waren dies also im wesentlichen Vergiftungserscheinungen, wie sie den Arsenpräparaten eigentümlich sind. Trotzdem ist in den Arbeiten der Kliniker immer wieder von der Wahrscheinlichkeit einer Anilinvergiftung nach Atoxylinjektion die Rede.

Wir haben es daher im folgenden unternommen, auf chemischem Wege diese Frage zu untersuchen durch Prüfung auf Produkte, die im Tierkörper aus Anilin entstehen, insbesondere auf Paramidophenol, als welches das Anilin bekanntlich zum größten Teil aus dem Tierkörper ausgeschieden wird. Als wir nun die α-Naphtholreaktion mit dem Harn von Menschen und Kaninchen, welche Atoxyleinspritzung erhalten hatten, anstellten, fanden wir dieselbe in demjenigen Harn, der in den ersten 24 Stunden nach der Einspritzung gelassen wurde, sehr stark. Die Reaktion wurde so angestellt, daß 10 ccm des Harns mit einigen Tropfen starker Salzsäure versetzt wurden. Dann wurden 2 bis 3 Tropfen einer 1%igen Natriumnitritlösung in der Kälte zugefügt, gut durchgeschüttelt und nunmehr einige Tropfen einer ziemlich konzentrierten, in Natronlauge gelösten Menge von α-Naphthol hineingegossen Beim Hineinfließen der α-Naphthollösung gibt der Harn eine wundervolle Rotfärbung, welche bei weiterem Zusatz von Natronlauge oder Ammoniaklösung bis zur alkalischen Reaktion noch an Intensität zunimmt. Gießt man in diese Probe ganz vorsichtig konzentrierte Salzsäure hinein, so entsteht eine violette Färbung. Der beim Schütteln der alkalischen Lösung

entstehende Schaum gibt beim Zufließenlassen von Salzsäure eine schöne himbeerviolette Färbung.

Den positiven Ausfall dieser Reaktion beim Atoxylharn halten wir nun aber nicht für eine Reaktion auf Anilin, denn das Atoxyl läßt sich, wie Ehrlich und Bertheim gezeigt haben, leicht diazotieren und mit β-Naphthylamin zu einem roten Farbstoff kuppeln. Einen roten Azofarbstoff gibt nun aber das Atoxyl, wie wir uns überzeugten, ebenfalls mit dem α-Naphthol. Deshalb sind wir der Ansicht, daß im Atoxylharn nach der eben angegebenen Reaktion sich ein roter Farbstoff bildet, der aber nicht auf einer Bildung von p-Amidophenol aus dem Atoxyl im Organismus beruht. Diese Ansicht wird durch den Nachweis erhärtet, daß die übrigen Reaktionen auf Anilin resp. p-Amidophenol im Atoxylharn negativ waren. Der Nachweis des Anilins im Harn kann geführt werden erstens durch den Nachweis von Anilin selbst, das nach reichlicher Zufuhr von Anilin gelegentlich im Harn gefunden wurde. Das Destillat eines solchen mit Kalilauge alkalisch gemachten Harns gibt mit Bromwasser eine fleischrote Färbung, wird auf Zusatz von wenig Chlorkalk violett und gibt die Millonsche Reaktion. Alle diese Reaktionen waren beim Atoxylharn negativ. In den meisten Fällen bildet sich nach der Eingabe von Anilinpräparaten das Alkalisalz der Paramidophenolschwefelsäure. Der Nachweis dieser Substanz geschieht in folgender Weise: Ca. 10 ccm Harn werden mit 2 ccm konzentrierter Salzsäure stark gekocht. Nach dem Erkalten werden einige Kubikzentimeter 3- bis 5%iger wässeriger Carbolsäurelösung hinzugefügt und tropfenweise stark verdünnte Chromsäure. Beim Zusatz der Chromsäure wird die Flüssigkeit braunrot bis rot, und nach dem Übersättigen mit Ammoniak (Überschichten) entsteht eine schöne grünblaue Farbe (Indophenolreaktion). Während diese Reaktion sich im Harn von Menschen, welche $^1/_2$ bis 1 g Phenacetin bekommen hatten, in den nächsten 24 Stunden stark positiv zeigte, auch noch nach sehr starker Verdünnung des Harns, war diese Reaktion nach Atoxylinjektion bis zu 0,4 g pro dosi in keiner der in den ersten 48 Stunden nach der Injektion gelassenen Urinportionen positiv oder auch nur angedeutet. Wir glauben daher, im Einklang mit den von dem einen von uns früher gemachten Untersuchungen bei der Sektion

von Kaninchen und einem Hunde, die mit Atoxyl vergiftet waren, daß eine nachweisbare Menge von Anilin nicht bei der Atoxylinjektion gebildet wird und daß daher die Vergiftungserscheinungen nach Atoxyl nicht als Anilinvergiftung gedeutet werden können.

Eine Anzahl Forscher, insbesondere Welander, vertreten die Ansicht, daß das Atoxyl als solches den Organismus verläßt. Diese Forscher berufen sich darauf, daß sie bei ihren Untersuchungen anorganisches Arsen, also arsenige Säure, nicht hätten im Harn nachweisen können. Man könnte nun infolge des positiven Ausfalls der α-Naphtholreaktion glauben, daß Atoxyl als solches in großer Menge im Harn von Menschen und Tieren, die mit Atoxyl behandelt waren, vorhanden ist. Diese Ansicht schien eine Stütze zu finden, als wir den nach der Atoxylinjektion (0,4 beim Menschen) in den ersten 24 Stunden gelassenen Harn nach der von Ehrlich und Bertheim für das Atoxyl angegebenen Diazotierungsmethode behandelten und mit β-Naphthylamin kuppelten. Es wurde in der gleichen Weise verfahren wie bei Anstellung der α-Naphtholreaktion, nur wurde an Stelle von α-Naphthol β-Naphthylamin in salzsaurer Lösung angewandt. Bei Anstellung dieser Reaktion bildete sich auf Zusatz von β-Naphthylamin allmählich eine dunkelrote Flüssigkeit und schließlich auch ein bräunlicher Niederschlag; dieser ist weder in Wasser, in Alkalien, Säuren, noch in Alkohol und Äther löslich. Der Körper unterschied sich also insofern von dem Atoxylfarbstoff, als er sich nicht beim Zusatz von Alkali mit schön roter Farbe löste, wie dies Ehrlich und Bertheim angegeben haben. Es dürfte daher die Reaktion mit β-Naphthylamin im Harn nicht dem unveränderten Atoxyl zukommen, sondern einem dem Atoxyl nahestehenden Körper, in welchen dasselbe auf seiner Passage durch den Organismus übergeführt wurde. Dieser Körper muß einerseits noch die Amidogruppe enthalten, wie die Farbstoffbildung zeigt, andererseits die Arsengruppe, denn eine Untersuchung des Farbstoffs auf Arsen ergab einen sehr reichlichen Arsengehalt.

Wir fanden sowohl beim Menschen wie beim Kaninchen, daß nach einer Einspritzung von 0,1 bis 0,4 g in jedem Falle der in den ersten 24 Stunden gelassene Harn eine starke α-Naphtholreaktion gab. Die Reaktion war auch noch in dem

Harn, der innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach der Injektion gelassen wurde, positiv. Später fanden wir die Reaktion nicht mehr, oder doch nicht deutlich. Daß die Reaktion nicht so lange sich im Harn nachweisen läßt, wie Arsen daselbst gefunden werden kann, ist wohl dadurch zu erklären, daß kleine Mengen die Reaktion nicht mehr deutlich geben. Der Nachweis des Arsens nach E. Salkowski[1]) ist eben ein feineres Reagens als die β-Naphtholprobe.

[1]) Berlin. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 4; Zeitschr. f. physiol. Chem., 56 (im Druck).

Über Desaminoproteine.

Von

Zd. H. Skraup.

(Aus dem II. chemischen Laboratorium der Universität Wien.)

(Eingegangen am 17. April 1908.)

Die Constitution der Proteine kann selbstverständlich auch in der Richtung erforscht werden, daß man unter Vermeidung von Hydrolyse an ihnen zunächst chemische Veränderungen vornimmt und sie sodann erst hydrolysiert und feststellt, ob und in welcher Art die Produkte der Hydrolysierung verschieden sind von jenen, welche aus den ursprünglichen Proteinen entstehen.

Diesen Weg habe ich teils selber, teils durch Schüler[1]) bei einigen Proteinen durch Einwirkung von salpetriger Säure versucht und dabei Resultate erhalten, die ich hier zusammenfassen will, ohne auf die experimentellen Details einzugehen; wegen diesen verweise ich auf die zitierten Quellen.

Bei der Analyse der ersten dieser „Desaminoverbindungen" ergab sich der Stickstoffgehalt so wenig geringer als der im ursprünglichen Protein, daß ich anfänglich annahm, daß diese geringe Differenz von Versuchsfehlern herrührt. Dieses Minus wurde bis auf eine später zu erwähnende Ausnahme aber regelmäßig wieder gefunden, es ging auch in einzelnen Fällen über die Analysenfehler hinaus, und ein Austritt von Stickstoff steht auch aus dem chemischen Verhalten der „Disaminoverbindungen"

---

[1]) Skraup u. Hörnes, Monatsh. f. Chem. **1906**, 631. — Skraup, Monatsh. f. Chem. **1906**, 653; **1907**, 447. — Skraup u. Kaas, Ann. **351**, 381, **1907**. — H. Lampel, Monatsh. f. Chem. **1907**, 625. — W. Traxl, Ebenda **1908**, 59.

so gut im Einklang, daß der schon von Schiff gewählte Name gerechtfertigt erscheint.

In folgender Tabelle gebe ich die Mittelzahlen der Analysen der bisher dargestellten Desaminoproteine. Ihr vorangestellt ist eine Zusammenstellung der Prozentzahlen jener Proteine, aus welchen die Desaminoverbindungen entstehen. Zum Teil wurden diese neu ermittelt, zum Teil wurden sie den Angaben des Lehrbuches von Cohnheim entnommen. In diesem Falle wurden die Mittelzahlen der von verschiedenen Autoren veröffentlichten Werte berechnet.

Casein nach Hammarsten[1])	Gelatine (Goldmarke)[1])	Ovalbumin krystallisiert	Serumglobin[1]) aus Pferdeblut von Höchst	Edestin von Höchst
C 53,00	50,07	52,99	52,71	51,05
H 7,08	6,87	7,26	7,01	6,81
N 15,70	18,07	15,50	15,83	18,92
O 22,60	24,49	22,01	23,30	22,15
S 0,78	0,50	1,40	1,15	1,06
P 0,84	—	0,84	—	—
		Desaminoverbindungen.		
C 51.85	50,65	51,14	52,07	51,09
H 6,98	6,80	6,94	6,77	6,98
N 15.19	16,83	14,88	14,93	19,62
O 23,98	25,58	23,61	25,13	21,25
S 0.78	0,14	2,25	1,19	1,06
P 0,22	—	2,38	—	—

Ein Vergleich beider Tabellen zeigt, daß mit Ausnahme des Edestins bei der Desamidierung tatsächlich eine Verminderung im Stickstoffgehalt eintritt. Beim Edestin tritt im Gegenteil eine zwar geringe aber doch über die Fehlergrenze hinausgehende Erhöhung des Stickstoffgehaltes ein. Sie läßt sich schwer erklären, weil, wie später hervorgeht, das Verhalten des Edestins bei der Desamidierung in der Hauptsache das gleiche ist wie das der übrigen Proteine.

Beim Casein, Ovalbumin, Serumglobulin und dem Glutin nimmt auch der Kohlenstoff infolge der Desamidierung ab, der Sauerstoffgehalt dafür zu. Beim Edesin ändert sich der C-Gehalt nicht, eine geringe Zunahme des Sauerstoffgehaltes ist aber hier zu bemerken.)

---

[1]) Cohnheim, Eiweißkörper.

Der Wasserstoffgehalt zeigt nirgends merkliche Unterschiede.

Der Schwefelgehalt ändert sich nicht beim Casein, Serumglobulin und Edestin, er vermindert sich beim Glutin, beim Ovalbumin vergrößert er sich, und bei diesem ebenso auch der Phosphorgehalt, während beim Casein eine Abnahme im Phosphorgehalt stattfindet.

Die Produkte der Hydrolyse der fünf Desaminoverbindungen durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure oder mäßig verdünnter Schwefelsäure wurden nur beim Casein eingehender untersucht. Bei den anderen wurden nur die Hexonbasen bestimmt. Es hatte sich beim Casein nämlich gezeigt, daß die meisten Aminoverbindungen, die aus dem ursprünglichen Casein durch hydrolytischen Zerfall entstehen, sich beim Desaminocasein wiederfinden und auch quantitativ keine oder nur geringe Unterschiede auftreten.[1]) Wesentliche Unterschiedlichkeiten treten aber bei den Hexonbasen auf, und diese gehen aus folgender Tabelle hervor.

	Proteine.				
	Casein	Gelatine	Ovalbumin	Serumglobulin	Edestin
Arginin	4,8	9,3	—	2,8	12,04
Clistidin	2,6	0,4	1,6	3,4	1,87
Lysin	5,8	5,5	3,5	4,2	1,15
	Desaminoproteine.				
Arginin	0,45	[2])	[3])	2,8	1,5
Clistidin	1,18	[2])	0,8	2,4	1,9
Lysin	—	—	—	—	—

Die Hydrolyse aller fünf Desaminoproteine zeigte, daß diese den Lysinrest nicht mehr enthalten.

Was das Arginin und Histidin betrifft, so wurden für die Desaminoverbindung aus Gelatine genaue Zahlen nicht ermittelt. Bei den vier anderen Proteinen stehen die Zahlen für das Histidin, sowohl bei den genuinen als den desamidierten so nahe, daß sie als gleich angenommen werden können, nur

[1]) Ob Desaminocasein kein Tyrosin gibt, wie ich und Hörnes angegeben haben, bedarf nochmaliger Untersuchung.

[2]) Nicht genauer angegeben, ähnlich wie beim Glutin.

[3]) Skraup u. Kaas haben nach der Kossel-Kutscher-Methode Arginin nicht gefunden, Hedin nach seiner Methode im rohen Eialbumin 0,8 %.

beim Casein ist die Differenz größer als durch Versuchsfehler erklärt werden kann.

Beim Arginin sind die Zahlen aber sehr ungleich.

Beim Serumglobulin wird durch Desamidierung der Argingehalt gar nicht geändert. Beim Casein und noch mehr beim Edestin wird er aber sehr stark herabgesetzt.

Wie das Verschwinden von Lysin und das Zurücktreten des Arginins zu erklären ist, kann mit Sicherheit nicht gesagt werden. Versuche, die bei der Gelatine eigens angestellt worden sind, haben sichere Resultate nicht ergeben.

Man kann aber doch mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die in Rede stehende Erscheinung mit der Abnahme des Stickstoffgehaltes bei den Desaminoverbindungen und weiterhin mit einem Eingriff der salpetrigen Säure in die Reste von Lysin, Arginin und Histidin in Zusammenhang steht. Und von dieser Annahme ausgehend kommt man nun zu dem weiteren Schlusse, daß in jenen Proteinen, in welchen diese Abnahmen eintreten, der Lysinrest und der Argininrest (Histidinrest) so angeordnet ist, daß eine Aminogruppe frei ist.

Und weiter kann man annehmen, daß in dem verwickelten Bau der Proteine, in welchem zweifellos sterische Behinderungen sich geltend machen werden, solche betreffend dieser Aminogruppe nicht bestehen, der Lysinrest und in manchen Proteinen der Argininrest deshalb für chemische Agenzien zugänglicher und mehr an der Oberfläche des Proteins anzunehmen ist.

In weiterer Verfolgung dieser Schlüsse wird es wahrscheinlich, daß die Annahme von Kossel, nach welcher der Argininrest den Kern der Proteine bildet, für die meisten der bisher von mir auf das Verhalten gegen salpetrige Säure untersuchten Proteine nicht Geltung hat.

Einige Bemerkungen über die Bangsche Methode der Zuckerbestimmung.

Von

H. Jessen-Hansen.

(Aus dem Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 24. April 1908.)

Herr Ivar Bang hat in dieser Zeitschr. 2, 271, 1906 eine Methode zur Bestimmung von Traubenzucker veröffentlicht, mit welcher ich einige Erfahrungen gemacht habe, die ich der Mitteilung wert halte, und die den Inhalt der folgenden Zeilen ausmachen.

Des leichteren Verständnisses wegen sei die Methode, wie sie von Bang gegeben ist, ganz kurz rekapituliert. 10 ccm der zu analysierenden Flüssigkeit werden mit 50 ccm einer rhodankaliumhaltigen Soldainischen Kupferlösung während drei Minuten auf dem Drahtnetze gekocht und nach Abkühlung der Überschuß von Cuprisalz mittels einer ebenfalls rhodankaliumhaltigen Lösung eines Hydroxylaminsalzes titriert, indem das Verschwinden der blauen Farbe als Indikator benutzt wird. Die Zugabe von Rhodankalium bewirkt, daß das Kupferoxydul nicht ausgeschieden wird, so daß man, wenn die Operation beendet ist, eine wasserhelle, farblose Flüssigkeit vor sich hat.

Die zwei Lösungen sind so gegeneinander gestellt, daß 50 ccm der Kupferlösung eben durch 50 ccm der Hydroxylaminlösung entfärbt werden, und in einer Tabelle gibt Bang die Zahl der Kubikzentimeter Hydroxylaminlösung an, welche 50 ccm der Kupferlösung nach Kochen mit verschiedenen Mengen, von 1 bis 60 mg, Traubenzucker entfärben. Bei der Entfärbung spielt sich nach den Versuchen Bangs etwa die folgende Reaktion ab:

$$10\,CuO + 8\,H_3NO = 5\,Cu_2O + N_2O + 3\,N_2 + 12\,H_2O.$$

Die Darstellung der Kupferlösung geschieht nach Bang, indem man 12,5 g reines $CuSO_4 + 5\,H_2O$ in ca. 75 ccm Wasser löst, bis etwa 15° C abkühlt, in eine auf Zimmertemperatur gebrachte Lösung von 250,0 g K_2CO_3, 200,0 g KCNS und 50,0 g $KHCO_3$ in 600 ccm Wasser unter Umrühren eingießt, und bis auf 1 Liter mit Wasser ergänzt. Die Temperaturgrenzen dürfen nicht überschritten werden.

Für die Darstellung der Hydroxylaminlösung schreibt Bang vor, daß man 6,55 g $(NH_3O)_2H_2SO_4$ in Wasser löst, mit einer Lösung von 200,0 g KCNS in ca. 1500 ccm Wasser vermischt und bis 2 Liter mit Wasser nachfüllt.

Wie man sogleich sieht, zeichnet sich die Methode durch eine außerordentliche Einfachheit aus, so daß, falls sie ebenso genau wie einfach ist, man sich kaum eine bessere vorstellen könnte, und Zweck meiner Versuche war eben, die Genauigkeit zu kontrollieren. Wie man später sehen wird, hat es sich gezeigt, daß die Methode im großen und ganzen eine hinreichende Genauigkeit gibt, besonders dann wenn, sie in gewissen Richtungen einer etwas genaueren Präzisierung unterzogen wird.

Das erste, was man zu tun hat, wenn man die Methode gebrauchen will, ist selbstverständlich die zwei Lösungen gegeneinander zu stellen. Hier bin ich aber auf eine unerwartete Schwierigkeit gestoßen. Denn das erstemal, als ich die Lösungen darstellte, stimmten sie vorzüglich überein, nach der Angabe Bangs, als ich aber später eine neue Kupferlösung machen wollte, war es mir lange nicht möglich, auch wenn ich, wie mich deuchte, noch so sorgsam nach der Vorschrift arbeitete, sie von derselben Titer wie die erste zu bekommen. Anstatt eine Kupferlösung, welche von einem gleichen Volumen der Hydroxylaminlösung entfärbt wurde, bekam ich immer eine, welche zur Entfärbung von 50 ccm nicht 50 ccm Hydroxylaminlösung, sondern gewöhnlich nur etwa 45, einmal 46 und einmal 48 ccm gebrauchte; bis zu 50 konnte ich es aber gar nicht mehr treiben. Den Grund dieser Abweichung fand ich endlich darin, daß ich, statt die 12,5 g Kupfersulfat abzuwägen und in der vorgeschriebenen Menge (75 ccm) Wasser zu lösen, eine äquivalente Menge — 54,34 g — von einer vorrätigen Kupfersulfatlösung nahm und in die Kalisalzlösung unverdünnt

eingoß, indem ich es mir eingangs überhaupt nicht einfallen ließ, daß dieser Unterschied bezüglich der Konzentration der Kupfersulfatlösung etwas bedeuten konnte. Am Ende wurde ich aber gezwungen, die Ursache der Abweichungen darin zu suchen, und der folgende Versuch, welcher mehrmals wiederholt wurde, hat zur Genüge bewiesen, daß sie eben darin steckt.

300,0 g KCSN
375,0 g K_2CO_3
und 75,0 g $KHCO_3$

wurden in einer Porzellanschale gut gemischt und mit 900 ccm destilliertem Wasser von 20° übergossen. Als die ersten 500 ccm zugegeben waren, stieg die Temperatur bis auf 35° als Folge der Wasseraufnahme des Kaliumcarbonats, fiel aber nach Zusatz der nächsten 400 ccm bis auf 17°, dank der Auflösungswärme des Rhodankaliums. Um eine vollständige Lösung des Bicarbonats zu bewirken, wurde auf dem Wasserbad unter guter Umrührung bis auf 40° erwärmt und sogleich nach der Lösung bis auf 17° wieder abgekühlt. Die, abgesehen von einigen Unreinigkeiten der Kalisalze, klare Flüssigkeit wurde durch Wägen in drei gleiche Teile geteilt.

Gleichzeitig wurden dreimal 6,25 g $CuSO_4$,5 aq abgewogen und in den folgenden Wassermengen gelöst:

a) in 70 ccm,
b) in 37,5 ccm nach der Vorschrift Bangs,
c) in 20 ccm.

Diese drei Kupfersulfatlösungen wurden dann auf 13° abgekühlt und in je eine Portion der Kalisalzlösung langsam unter tüchtiger Umrührung gegeben, in der Weise, daß der momentan gebildete Niederschlag größtenteils wieder aufgelöst war, bevor ein weiterer Zusatz erfolgte. Der einzige Unterschied, welcher sich bei der Vermischung zeigte, war, daß der augenblicklich entstehende Niederschlag in c etwas dunkler und mehr bräunlich gefärbt und etwas langsamer löslich war als in b und in dieser wieder ein bißchen dunkler als in a. Sogleich nach der Vermischung wurde jede Portion in einem Meßkolben auf 500 ccm aufgefüllt und bis zum nächsten Tag beiseite gestellt. Dann war in allen drei Kolben ein kleiner weißer Bodensatz, wohl von Kaliumbicarbonat, entstanden. Derselbe wurde abfiltriert, ganz nach der Vorschrift Bangs,

und die drei Lösungen auf die Hydroxylaminlösung gestellt. Dabei haben 50 ccm von

a) 50,5 ccm Hydroxylaminlösung,
b) 50,0 „ „ und
c) 45,0 „ „

zur Entfärbung gebraucht.

Der eigentliche Grund dieses sonderbaren Unterschiedes ist nicht leicht anzugeben. Herr Professor Bang, welchem ich eine Mitteilung darüber gab, und der meinen Befund durch eigene Versuche bestätigt hat, ist der Ansicht, daß er in einer verschiedenen Reduktion der Kupferlösung durch die Kalisalzlösung zu suchen sei; für diese Auffassung spricht, daß, wenn man 10 ccm jeder der drei obengenannten Flüssigkeiten mit 50 ccm Wasser verdünnt, dann scheidet sich in c sofort ein weißer feinkörniger Niederschlag ganz vom Aussehen des Kupferrhodanürs aus, während a und b klar bleiben. Gibt man aber noch 30 ccm Wasser zu jeder Probe, entsteht in allen drei ein grünlicher, flockiger Niederschlag, der eher wie basisches Kupfercarbonat oder dergleichen aussieht. Näher auf diese Frage einzugehen habe ich aber nicht Gelegenheit gehabt.

Man wird hieraus ersehen, daß es absolut notwendig ist, bei der Darstellung der Kupferlösung nicht nur, wie es Bang vorschreibt, die Temperaturgrenzen innezuhalten, sondern wenigstens ebenso genau zu überwachen, daß die zusammenzugießenden Flüssigkeiten genau von der vorgeschriebenen Konzentration sind, zumal man nicht imstande ist, die einmal hergestellte Lösung später zu verbessern.

Die Stellung der zwei Lösungen — kurzheitshalber werde ich sie die weiße und die blaue nennen — gegen einander geschieht, indem man zu 50 ccm der blauen Lösung 10 ccm Wasser gibt, um in demselben Volumen wie bei der Zuckerbestimmung zu arbeiten, und darauf aus einer Bürette die weiße Lösung so schnell wie möglich unter stetem Umschwenken zufließen läßt, bis die blaue Farbe völlig verschwunden ist. Die Schnelligkeit des Zuflusses ist nicht ohne Belang, was die folgenden Versuche dartun:

a) 50 ccm der blauen Lösung verbrauchten zur Entfärbung 48,8 ccm der weißen, indem der Zufluß mit einer

gleichmäßigen Geschwindigkeit von 5 ccm in 15 Sekunden stattfand;

b) wenn der Zulauf mit 10 ccm in 15 Sekunden geschah, wurden 49,7 ccm der weißen Lösung verbraucht;

c) war die Geschwindigkeit des Zulaufes 20 ccm in 15 Sekunden, wurden 50,0 ccm der weißen Lösung zum Entfärben verlangt, und

d) war die Geschwindigkeit 30 ccm in 15 Sekunden, verlangten 50 ccm der blauen Lösung 50,5 ccm der weißen, um völlig entfärbt zu werden.

Die gewöhnlich verwendete Geschwindigkeit wird ungefähr 20 ccm in 15 Sekunden betragen.

Auch ist die Temperatur, bei welcher man titriert, nicht ganz gleichgültig, was die folgenden Versuche beweisen:

50 ccm der blauen Lösung verbrauchten zur völligen Entfärbung, Geschwindigkeit des Zulaufes 10 ccm in 15 Sekunden,

e) wenn sie beim Anfang der Titrierung 32° warm waren, 48,5 ccm der weißen Lösung;

f) wenn sie 18,5° warm waren (Zimmertemperatur), 49,7 ccm, und

g) wenn die Anfangstemperatur 8° betrug, 50,5 ccm.

Die Temperatur der weißen Lösung war bei allen 3 Versuchen dieselbe, nämlich 18,5°.

Auch das Volumen hat einen Einfluß — was auch Bang bemerkt —, der nicht vernachlässigt werden darf;

h) 50 ccm der blauen Lösung + 10 ccm Wasser verbrauchten 50 ccm der weißen, während

i) sie ohne Wasserzusatz durch 49,3 ccm entfärbt wurden.

Schließlich möchte ich, was die Einstellung der Lösungen betrifft, nur noch bemerken, daß es mir nicht gelungen ist, den Endpunkt der Titration durch Zusatz von 0,1 ccm genau zu erkennen; ich habe immer 0,25 ccm oder 4 bis 5 Tropfen zugeben müssen, um mit Sicherheit den Übergang von bläulich an ungefärbt wahrnehmen zu können.

Etwas anders liegt die Sache in der Analyse; wenn reduzierter Zucker in der Flüssigkeit anwesend ist, wird die Nuance etwas verschieden, so daß der Übergang schärfer erscheint, und

dann läßt er sich meistens wohl durch Zusatz von 2 Tropfen oder 0,1 ccm erkennen.

Eigentlich sollte die Einstellung der Flüssigkeiten natürlich wie ein blinder Versuch ausgeführt werden, das heißt: die 50 ccm der blauen Lösung + die 10 ccm Wasser sollten durch Erhitzen auf dem Drahtnetze in 3 Minuten zum Sieden gebracht werden, weiter sieden in 3 Minuten, weiter schnell zur Zimmertemperatur abgekühlt werden, um erst dann durch die weiße Lösung zur Farblosigkeit titriert zu werden, indem das Kochen der blauen Lösung einen Minderverbrauch der weißen bedingt, welcher in der durch die Verdampfung herbeigeführten Konzentrationsänderung seinen Grund hat, wie die folgenden Versuche zeigen (vgl. auch die Versuche h und i S. 253):

a) 50 ccm der blauen Lösung + 10 ccm Wasser verbrauchten zur Entfärbung 50 ccm der weißen Lösung.

b) 50 ccm der blauen Lösung + 10 ccm Wasser in 3′ 30″ zum Sieden gebracht und darauf das Kochen 3′ fortgesetzt, verbrauchten nach Abkühlung 49,5 ccm der weißen Lösung. Das Gesamtvolumen betrug aber jetzt statt 109,5 ccm nur 101,5 ccm; es sind somit 8 ccm Wasser verdampft.

c) Als b, aber nach der Abkühlung zugegeben 8 ccm Wasser vor der Titrierung. Verbraucht 50 ccm der weißen Lösung.

Da aber die Verdampfung etwas verschieden sein kann, je nachdem das Kochen mehr oder weniger lebhaft gewesen ist, wird man wohl sicherer gehen, wenn man die Einstellung, so wie ich es gemacht habe, ausführt, vorausgesetzt natürlich, daß die Einstellung, auf welcher die Tabellen fußen, in derselben Weise gemacht ist, oder anders gesagt, daß der Nullpunkt der Tabelle nicht einem Verbrauch von 50 ccm, sondern etwas weniger entspricht.

In welcher Weise Bang die seiner Tabelle zugrunde liegende Einstellung gemacht hat, ist weder in seiner eingangs zitierten Abhandlung noch in seiner später erschienenen Tabelle (Methode der Zuckerbestimmung. Verlag von J. Springer, 1908) direkt angegeben. Ich muß aber annehmen, daß er, ebenso wie ich, die Einstellung ohne vorhergehendes Kochen der

blauen Lösung und ohne Rücksicht auf die dadurch entstehenden Verschiebungen des Nullpunktes vorgenommen hat, weil die nach seiner Vorschrift zubereiteten Lösungen nur dann einander genau, Kubikzentimeter für Kubikzentimeter entsprechen.

Aus dem hier Auseinandergesetzten wird hervorgehen, daß eine Änderung der Versuchsbedingungen einen nicht unerheblichen Unterschied der Resultate bedingen wird. Das ist übrigens nur, was zu erwarten wäre, indem in einer Reaktion wie die durch die Gleichung

$$10\,CuO + 8\,NH_3O = 5\,Cu_2O + 12\,H_2O + N_2O + 3\,N_2$$

ausgedrückte, das Verhältnis zwischen Stickstoffoxydul und freiem Stickstoff sich offenbar leicht durch die Versuchsbedingungen verschieben läßt. Andererseits ist die von Änderungen der Bedingungen hervorgerufenen Variationen der Resultate nicht von der Größenordnung, daß sie die Methode unbrauchbar machen, nur darf man sie nicht außer acht lassen.

Gehen wir jetzt zur Betrachtung der von Bang gegebenen Tabelle über, dann drängt sich zuerst die Bemerkung auf, daß das gewählte System kein glückliches ist. Die Tabelle gibt nämlich die Zuckermenge, welche anwesend ist, wenn eine bestimmte Anzahl Kubikzentimeter der weißen Lösung zur Entfärbung der mit der Zuckerlösung gekochten 50 ccm der blauen Lösung verbraucht wird. Mit anderen Worten, die Tabelle gibt den Rest des in 50 ccm anwesenden Cuprisalzes, welcher nicht vom Zucker reduziert worden ist, was notwendig eine Summierung von verschiedenen Fehlern in sich birgt, und es setzt jedenfalls voraus, daß die zwei Lösungen beide ganz „richtig" sind, das heißt, daß sie nicht nur gegenseitig genau sind, sondern auch mit den von Bang bei der Ausarbeitung der Tabelle gebrauchten genau übereinstimmen.

Mehr sachgemäß wäre es gewesen, wenn die Tabelle die mit der betreffenden Zuckermenge äquivalente Menge der weißen Lösung gegeben hätte, oder anders gesagt, wenn es die Differenz zwischen der zur Entfärbung von den 50 ccm blauer Lösung mit und ohne Zuckerzusatz verwendete Menge der weißen Lösung wäre, welche man in der Tabelle zu suchen hätte. Im letzteren Falle würde man, beim Gebrauch von Lösungen, die nur beinahe „richtig" wären, Resultate bekommen, die sich der Wahrheit mehr näherten als bei der Benutzung der Tabelle

in ihrer jetzigen Form. Ein Beispiel wird das Gesagte verdeutlichen:

50 ccm einer blauen Lösung, welche 43,5 ccm der weißen zur Entfärbung verbrauchten, verlangten nach dem Kochen mit 50 mg Glucose 2,6 ccm der weißen Lösung, um entfärbt zu werden. In der Tabelle findet man, daß ein solcher Verbrauch 56,1 mg Zucker entspricht, somit beträgt der Fehler 6,1 mg. Sucht man dagegen in der Tabelle die mit den Differenz 43,5 — 2,6 = 40,9 ccm äquivalente Menge Zucker, was man in Bangs Tabelle unter 9,1 (= 50 — 40,9) findet, ist sie = 44,6 mg, und der Fehler beträgt nur 5,4 mg. Noch günstiger stellt es sich, wenn weniger Zucker anwesend, der Überschuß an Cuprisalz somit größer, ist: 50 ccm der genannten blauen Lösung mit 25 mg Glucose gekocht, verbrauchten zur Entfärbung 19,6 ccm der weißen Lösung. Die Tabelle gibt den entsprechenden Wert = 30,9 mg Glucose, Fehler 5,9 mg, während man auf die andere Rechnungsart 22,8 mg findet, Fehler nur 2,2 mg. Natürlich will niemand eine Kupferlösung von einer solchen Titer verwenden, sie ist aber gewählt, um den Ausschlag zu verdeutlichen, und je näher „richtig" die Lösungen sind, je näher richtig werden natürlich die durch ihren Gebrauch gewonnenen Resultate sein.

Hat man aber zwei „richtige" Lösungen, dann wird man wohl auch die von Bang gegebene Tabelle verwenden können. Die von mir gemachten Kontrollversuche haben Werte gegeben, welche wenigstens ebensogut mit der Tabelle als untereinander übereinstimmen, wie die folgende Tabelle zeigt:

Milligramm Glucose	Bei der Zurücktitrierung wurden verbraucht Kubikzentimer Hydroxylaminlösung:	
	Von J.-H.	Nach der Tabelle B.
50	5,9 — 5,7 — 5,3 5,3 — 5,3 — 5,6	5,9
25	23,7 — 23,1 — 23,6 23,9 — 24,0	24,1
5	43,8	43,85
1	48,0 — 48,1	48,9

Der prozentisch große Unterschied zwischen den Wert

Bangs und den meinigen für 1 mg Glucose rührt wahrscheinlich von der Seite 255 besprochenen Verschiebung des Nullpunktes her, indem es scheint, als ob Bang den letzten Teil seiner Tabelle aus seinen Versuchen mit 5 mg Glucose (l. c. S. 286) extrapoliert hat. Übrigens ist, wie man sieht, die Übereinstimmung meiner Versuche mit den gleichen Zuckermengen nicht ganz so gut, wie Bang sie bekommen hat, ohne daß ich imstande bin, eine weitere Erklärung darüber zu geben, als die, welche aus dem Vorhergehenden sich ableiten läßt.

Wenn ich jetzt schließlich mein Urteil über die Methode zusammenfassen soll, wird es etwa folgendermaßen lauten:

Die Methode ist viel bequemer als irgendeine andere mir bekannte, und wenn man die Lösungen in jeder Beziehung peinlich genau nach der von Bang gegebenen Vorschrift darstellt und ebenfalls bei der Ausführung der Analyse immer genau auf dieselbe Weise arbeitet, ist auch die Genauigkeit für die meisten und besonders für vergleichende Zwecke eine genügende. Sie verdient deshalb unbedingt eine weitere Bearbeitung, welche ihre Anwendung auch für die Bestimmung anderer reduzierender Zuckerarten ermöglichen würde. Wenn man aber die äußerste Genauigkeit, die zu erreichen ist, verlangt, ist, soweit ich sehen kann, nach wie vor nur die von J. Kjeldahl gegebene Modifikation der Reduktion durch Fehlingsche Lösung zu verwenden.

Über das Verhalten des Salicins im normalen und diabetischen Organismus.[1])

Von

Kaoru Omi.

(Aus dem chem. Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 28. April 1908.)

Die Veranlassung zu den folgenden Untersuchungen gab eine Mitteilung, welche Jayme Ferreira auf dem 15. internationalen medizinischen Kongreß in Lissabon gemacht hatte[2]): es sollte möglich sein, aus dem Verhalten der Salicylsäureausscheidung nach Eingabe von Salicin einen Schluß auf die Pankreasfunktion zu machen. Auf Wunsch von Herrn Geheimrat Garré unternahm ich unter Leitung von Herrn Prof. Röhmann eine Prüfung der experimentellen Grundlagen, auf welche sich diese Angabe stützen konnte, weniger deswegen, weil ich jene Angabe von vornherein für richtig hielt, als weil über das Verhalten der Glykoside im Organismus bisher nur wenig bekannt ist.

Die Tatsache, daß nach Eingabe von Salicin Salicylsäure im Harn ausgeschieden wird, ist lange bekannt. Sie setzt voraus, daß das Salicin gespalten und das hierbei entstehende Saligenin oxydiert wird.

$$\underset{\text{Salicin}}{C_6H_{11}O_5 \cdot OC_6H_4 \cdot CH_2(OH)} + H_2O = \underset{\text{Glykose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Saligenin}}{C_6H_4\begin{cases}OH\\CH_2(OH)\end{cases}}$$

$$\underset{\text{Saligenin}}{C_6H_4\begin{cases}OH\\CH_2(OH)\end{cases}} + O_2 = \underset{\text{Salicylsäure}}{C_6H_4\begin{cases}OH\\CO_2H\end{cases}} + H_2O.$$

[1]) vgl. Kaoru Omi, Das Verhalten des Salicins im tierischen Organismus. Inaug. Dissert. Breslau 1907.

[2]) Ref. Münch. med. Wochenschr. 1906, 992.

Es fragt sich zunächst, wie und wo die Spaltung erfolgt. Ferreira scheint anzunehmen, daß das diastatische Ferment des Pankreassekretes die Spaltung im Darme bewirkt. Nun ist es aber eine Tatsache, daß Glykoside nicht durch die Diastase gespalten werden. Salicin wird gespalten durch dasselbe Ferment, welches Amygdalin und einige andere Glykoside zerlegt, durch Emulsin. Quercitrin, Solanin und Arbutin werden durch Emulsion nicht gespalten.

Im ganzen Darmkanal ist aber kein Enzym vorhanden, welches auf Salicin wirkt. Ich überzeugte mich davon, daß weder der Speichel noch Extrakte des Pankreas, noch Extrakte der Dünndarmschleimhaut auf Salicin einwirkten, während dieses durch Kahlbaumsches Emulsin leicht gespalten wurde.

Die Spaltung des Salicins läßt sich außer durch Emulsin auch noch erzielen durch die Fäulnis.[1])

Die Spaltung des Salicins, welches bei einem Menschen nach der Aufnahme per os eintritt, erfolgt also nicht durch ein in den Darm hinein abgesondertes Enzym, besonders nicht durch ein vom Pankreas gebildetes Enzym, sondern kann durch die Darmfäulnis bewirkt werden.

Damit scheint zunächst der Ferreiraschen Methode der Boden entzogen zu sein.

Es liegen nun aber Beobachtungen vor, nach denen Glykoside schon im oberen Teil des Dünndarms resorbiert werden und zum Teil unverändert in den Harn übergehen.[2]) Werden aber nicht auch Glykoside in den Geweben zerlegt?

Um dies zu prüfen, untersuchte ich die Wirkung von Organextrakten auf Salicin.

Etwa 20 g der fein zerkleinerten Leber oder Niere vom Mensch, Hund oder Kaninchen wurden mit 100 ccm Chloroformwasser, dem 2 ccm 10 % alkoholische Thymollösung zugesetzt worden waren, etwa 24 Stunden bei Zimmertemperatur extrahiert. Von den Extrakten wurden 30 ccm mit 1 g Salizin 24 Stunden in der Wärme stehen gelassen. Nach Zusatz von etwas Kochsalz wurde im Wasserbade erhitzt und tropfenweise ver-

[1]) s. auch E. Salkowski u. J. Munk, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 367.

[2]) H. Ranke und Erdmann, Zeitschr. f. prakt. Chem. 56, 15, 1852. Zit. nach Grisson (s. u.). Weith, Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 10, 979, 1877.

dünnte Essigsäure hinzugefügt, bis das Eiweiß koagulierte. Das abgekühlte Filtrat wurde mit Äther ausgeschüttelt, der Äther verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst und mit Eisenchlorid geprüft. Blaufärbung bewies die Anwesenheit von Saligenin, d. h. die eingetretene Spaltung.

Es ergab sich, daß Blut und Muskel weder bei Kaninchen noch bei Hunden das Salicin zerlegen. Bei der Prüfung von Leber und Niere zeigte sich ein sehr auffallender Unterschied zwischen dem Hunde einerseits und Kaninchen, Hammel, Schwein, Rind andererseits. Von den Organen des ersteren wurde das Salicin gar nicht oder nur in Spuren zerlegt, von denen der letzteren dagegen in mehr oder größerem Umfange. Der Ätherrückstand bei jenen war spärlich und gab keine oder nur schwache Eisenchloridreaktion, bei diesen war er reichlicher; beim Kaninchen blieb nach Verdunsten des Äthers eine erhebliche Menge Substanz zurück, die aus Benzol, wie Saligenin krystallisierte, starke Eisenchloridreaktion gab, aber einen etwas zu niedrigen Schmelzpunkt (75°) zeigte.

Auch die Leber des Menschen zerlegt das Salicin nur wenig, die Niere vielleicht gar nicht.

Als ich diese Beobachtungen bereits gemacht hatte, fand ich in einer sehr lesenswerten Dissertation, die von H. Grisson unter der Leitung von O. Nasse gemacht worden war, ganz ähnliche Versuche[1].)

Hier wurde der Brei von frischen Organen mit Salicin, Helicin und Arbutin versetzt und nach einiger Zeit untersucht, ob eine Spaltung eingetreten war. Es zeigte sich ebenfalls, daß Blut und Muskeln weder bei Hund noch bei Katze und Kaninchen auf Salicin, sowie Helicin und Arbutin einwirkten. Die Lunge von Hund und Katze zerlegte nur Arbutin, die Leber und Niere vom Hunde wirkte nicht auf Salicin, meist auch nicht auf Helicin, aber auf Arbutin; Leber und Niere des Kaninchens spaltete alle Glykoside, die Leber der Katze spaltete Helicin und Arbutin. Salicin wurde nicht geprüft. Abgesehen von den Unterschieden, welche dieselben Organe gegenüber den verschiedenen Glykosiden zeigten, Unterschiede, die uns hier im Augenblick nicht interessieren, tritt uns derselbe Unterschied der Leber und auch der Niere

[1]) Über das Verhalten der Glukoside im Tierkörper, Inaug.-Diss. Rostock 1887. — Maly, Jahresber. f. Tierchem. 17, 91, 1887.

des Hundes gegenüber der des Kaninchens in bezug auf die Salicinspaltung entgegen, den auch ich soeben beschrieb.

Gegen diese Versuche von Grisson ließe sich nur der Einwand erheben, daß sie ohne Zusatz eines Antiseptikums angestellt waren. Er fällt aber deswegen weniger ins Gewicht, weil die Versuche nur von kurzer Dauer waren und die Versuche mit den Organen des Hundes nicht in so typischer Weise negativ ausgefallen wäre, wenn bei ihnen die Fäulnis eine wesentliche Rolle gespielt hätte.

Grisson versuchte auch mit Organextrakten die Spaltung der Glykoside zu erhalten. Er benutzte aber zur Extraktion Glycerin, und die mit diesen Extrakten ausgeführten Versuche fielen negativ aus. Es schien ihm deshalb, „als ob die wirksame Kraft sich nicht aus den Zellen extrahieren ließe, daß sie entweder unlöslich ist oder mit den Zellen gleichzeitig abstirbt oder überhaupt nicht als Substanz vorhanden ist, sondern eine Funktion der lebenden Organzelle selbst darstellt".

Im Gegensatz hierzu zeigen meine Versuche, daß die Spaltung des Salicins und somit auch vermutlich die der betreffenden anderen Glykoside durch eine Substanz bewirkt wird, die sich den Organen durch Wasser entziehen läßt. Wir können also sagen, die Leber und Niere des Pflanzenfressers (Kaninchen, Hammel, Rind und Schwein) enthalten ein Salicin spaltendes Enzym, ein Emulsin, das in den Organextrakten der Fleischfresser in manchen Pällen gar nicht, in anderen nur mit schwacher Wirkung nachweisbar ist. Ähnlich dem Fleischfresser verhält sich der Mensch.

Diese Unterschiede der Fermentwirkung brauchen jedoch nicht notwendig auf einem verschiedenen Fermentgehalt zu beruhen, denn sie können auch dadurch sich erklären, daß in den Organen Substanzen enthalten sind, welche die Fermentwirkung in positivem oder negativem Sinne beeinflussen, sie hemmen oder verstärken. Die Möglichkeit, daß Stoffe in der Leber vorhanden sind, die in dieser Weise wirken, kann man nicht leugnen, um so weniger, als Grisson gezeigt hat, daß die Glykosidspaltung durch einen Stoff wie Chinin mehr oder weniger vollständig gehindert wird.

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen an Organextrakten steht das Verhalten der Ausscheidung von Salicylsäure nach subcutaner und intravenöser Injektion von Salicin. Wie schon Marmé[1]) fand, verhalten sich hierbei der Hund und die Katze anders als das Kaninchen. Beim Fleischfresser läßt sich im Harn mittels Eisenchlorid keine oder nur eine geringe Menge Salicylsäure nachweisen, beim Kaninchen ist die Eisenchloridreaktion eine starke. Ein ähnlicher Unterschied zeigt sich auch beim Fütterungsversuche. Die Salicylsäurereaktion fiel im Harn des Kaninchens nach Eingabe von Salicin stets stärker aus, als beim Hunde. Die Ursache hierfür konnte auf eine verschiedene Fermentationskraft der Organe, im besonderen der Leber des Fleisch- und Pflanzenfressers bezogen werden, aber auch auf einer verschiedenen Stärke der Fäulnisspaltung im Darm beruhen. Durch den Einfluß der letzteren ließ sich erklären, daß sowohl beim Kaninchen wie beim Hunde nach der Eingabe per os anscheinend mehr Salicylsäure ausgeschieden wurde, als nach subcutaner Ein-Einspritzung der gleichen Menge Salicin.

Diese Beobachtungen ließen es aber wieder als möglich erscheinen, daß, wenn auch nicht die Theorie Ferreiras, so doch seine Beobachtungen richtig waren und veranlaßten mich, bei Hunden nach der Exstirpation des Pankreas das Verhalten des Salicins zu prüfen. Ich konnte aber nach der Eingabe per os keinen deutlichen Unterschied in der Salicylsäureausscheidung feststellen. Dagegen war die Salicinspaltung durch die Leberextrakte nach der Pankreasexstirpation in allen Fällen stärker als bei Lebern von normalen Hunden.

Um zu sehen, ob in der Leber von normalen Hunden vielleicht ein Stoff vorhanden war, welcher die Glykosidspaltung hemmte, erwärmte ich die Extrakte 1 Stunde auf 50° C und ließ das klare Filtrat auf Salicin einwirken. Eine Spaltung trat nicht ein. Die in gleicher Weise hergestellten Extrakte der Lebern von pankreaslosen Hunden zerlegten das Salicin stark.

In einigen weiteren Versuchen prüfte ich eine Mischung

---

[1]) Jahresber. f. Tierchem. 8, 193, 1878.

von 20 ccm Leberextrakt und 2 ccm Pankreasextrakt oder 20 ccm Pankreasextrakt und 2 ccm Leberextrakt von normalen Hunden, auch hier ohne Spaltung des Salicins zu beobachten.

Ich muß es demnach als ein sicheres Resultat betrachten. daß in der Leber von Hunden nach der Exstirpation des Pankreas eine Emulsinwirkung nachweisbar ist, die sich bei normalen Hunden nicht findet.

Die weitere Untersuchung soll sich auf das Verhalten der Leberextrakte pankreasloser Hunde zu anderen Glykosiden erstrecken, sowie auf das Verhalten zu gepaarten Glykuronsäuren, auch soll eine Methode gesucht werden, um die Stärke dieser Fermentwirkung zahlenmäßig auszudrücken.

Die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuren im Harn nach Einführung von Salicin in den Körper des gesunden und des pankreaslosen Hundes.

Von

Chasaburo Kusumoto aus Osaka (Japan).

(Aus dem chem. Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 28. April 1908.)

Bei den Versuchen über das Verhalten des Salicins im Körper des gesunden und diabetischen Hundes hatte K. Omi das Verhalten der Salicylsäureausscheidung im Harn mit Hilfe der Eisenchloridreaktion verfolgt. Genaue Bestimmungen der Salicylsäure sind zurzeit mangels einer geeigneten Methode nicht möglich. Von dem Saligenin, das durch Spaltung des Salicins im Organismus entsteht, wird aber nur ein Teil zu Salicylsäure oxydiert, ein anderer Teil wird als Ätherschwefelsäure ausgeschieden, wie dies schon von E. Baumann und E. Herter[1]) gefunden worden war.

Mit Rücksicht auf die Beobachtung, daß beim Pflanzenfresser nach Eingabe von Salicin anscheinend mehr Salicylsäure ausgeschieden wird als beim Fleischfresser, schien es nicht ohne Interesse, auch das Verhalten der Ätherschwefelsäuren beim Fleisch- und Pflanzenfresser nach Darreichung von Salicin zu untersuchen.

Eine weitere Frage war die, wie sich die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuren beim Hunde nach Eingabe von Salicin vor und nach der Pankreasexstirpation verhielt. Denn man konnte auf diesem Wege erkennen, ob durch die Pankreasexstirpation die Salicinspaltung in den Geweben, speziell in der

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**, 244, 1877.

Leber beeinflußt wurde, vorausgesetzt, daß die Synthese der Ätherschwefelsäuren auch nach der Pankreasexstirpation in gewöhnlicher Weise erfolgte. Zur Beantwortung dieser Fragen stellte ich die folgenden Versuche unter Leitung von Prof. F. Röhmann an Kaninchen und Hunden an.

Die Kaninchen befanden sich in einem Käfig, in dem der Harn ohne Verlust gesammelt wurde. Die 24stündige Menge suchte ich durch Auspressen der Blase zu erhalten. Die Hunde wurden im Stoffwechselkäfig gehalten, mit abgewogenen Mengen Pferdefleisch und Speck, gelegentlich auch mit einer gewissen Menge Milch gefüttert. Der Harn wurde täglich um dieselbe Zeit mittels Katheter abgegrenzt.

Die Bestimmung der Ätherschwefelsäure geschah nach E. Salkowski. Das Bariumsulfat wurde auf einem mit Asbest beschickten Gootschtiegel aus Porzellan gesammelt.

I. Versuche an Kaninchen.

1. Salicin subcutan.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäuren als $BaSO_4$	Der Harn dreht	Salicylsäurereaktion	Bemerkungen
17. Febr.	3,38	86	0,1170	nicht		Das Kaninchen erhält als Futter Hafer u. Wasser. Am 21. und 22. Februar je 2 g Salicin subcutan.
18. „	3,37	118	0,1132	„		
19. „	3,35	119	0,0738	„		
20. „	3,35	142	0,1358	„		
21. „	3,30	63	0,0650	„		
22. „	3,20	144	0,2019	links 24′	sehr stark	
23. „	3,12	85	0,2195	„ 30′	„	
24. „	3,05	113	0,1173	„ 7′	schwach	
25. „	3,05	95	0,0646		sehr schwach	
26. „	2,95	89	0,0854			
27. „	2,95	69	0,0338			

An den drei Tagen, die der Salicininjektion vorhergingen, schied das Kaninchen im Tage durchschnittlich eine Menge von Ätherschwefelsäuren aus, die einer Menge von 0,0915 g $BaSO_4$ entsprachen. Addiert man die $BaSO_4$-Werte der drei folgenden Tage, die unter dem Einfluß der Salicininjektion standen, und subtrahiert von dieser Summe $3 \times 0{,}0915$, so erhält man einen

Wert von 0,2642 g $BaSO_4$, welcher etwa der Zunahme entspricht, die auf den Übergang von Saligeninschwefelsäure in den Harn zu beziehen ist. Berechnet man aus dem Bariumsulfat die entsprechenden Mengen Salicin, welche bei der Saligeninbildung gespalten wurde und bezieht die Werte auf 1 g eingeführtes Salicin, so ergibt sich: Zunahme der Ätherschwefelsäuren für 1 g subcutan eingeführtes Salicin 0,064 g $BaSO_4$ entsprechend 0,0784 g Salicin.

2. Salicin per os.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäuren als $BaSO_4$	Der Harn dreht im 1 dcm-Rohr	Salicylsäure reaktion	Bemerkungen
27. Febr.	2,95	69	0,0838			Nahrung: Hafer und Wasser.
28. „	2,90	64	0,0901			
1. März	2,80	77	0,0659			Am 1. u. 2. März je 2 g Salicin per os.
2. „	2,70	90	0,2751	links 40′	sehr stark	
3. „	2,65	98	0,3256	„ 42′	„	
4. „	2,62	52	0,0776	„ 7′	stark	
5. „	2,52	83	0,1086		sehr schwach	

In gleicher Weise berechnet betrug die Zunahme der Ätherschwefelsäure für 1 g per os aufgenommenes Salicin 0,1096 g $BaSO_4$ entsprechend 0,133 g Salicin. Die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuren war also ebenso wie anscheinend auch die Salicylsäureausscheidung nach der Darreichung per os größer als nach der subcutanen Einspritzung.

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, dreht der Harn sowohl nach der subcutanen Einspritzung von Salicin, wie nach der Darreichung per os links. Diese Drehung schien nicht darauf zu beruhen, daß ein Teil des abgespaltenen Saligenins sich mit Glykusosäure verbunden hatte. Es schien vielmehr unverändertes Salicin in den Harn überzugehen.[1])

Salicin dreht links und zwar ist in 5%iger Lösung das Drehungsvermögen $[\alpha]_D$ gleich $-62{,}56°$. Nimmt man nun an, daß die Linksdrehung nur durch Salicin bedingt war, so wurden nach der Darreichung von 4 g per os am ersten Tage 0,96 g,

[1]) H. Ranke und Erdmann, Journ. f. prakt. Chem. **56**, 15, 1852. Weith, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **10**, 679, 1877.

am zweiten 1,09 g, am dritten Tage 0,097 g, im ganzen also etwa 2,15 g unverändert durch den Harn ausgeschieden. Die Menge Salicin, die dem als Ätherschwefelsäuren ausgeschiedenen Saligenin entspricht, war 0,532. Von den eingeführten 4 g Salicin ließen sich also als Saligenin bzw. unverändertes Salicin etwa 2,67 g wieder finden. Von dem Rest wurde ein Teil in Form von Salicyl- bzw. Salicylursäure ausgeschieden, ein Teil vielleicht im Körper verbrannt, ein anderer verließ vielleicht auch mit den Faeces den Körper.

Nach subcutaner Einspritzung von 4 g Salicin wurden von dem Kaninchen ausgeschieden am ersten Tage 0,92 g, am zweiten 0,68 g, am dritten 0,21 g, im ganzen also etwa 1,81 g Salicin. Rechnet man dazu die der Saligeninschwefelsäure entsprechende Menge von 0,3136 g, so wurden vom eingeführten Salicin im Harn wieder gefunden 2,12 g, also etwas weniger als nach der Darreichung per os. Hier fällt die Möglichkeit, daß ein Teil des Salicins durch die Faeces ausgeschieden wurde, fort. Der fehlende Rest war also entweder durch die Nieren in Form von Salicylsäure ausgeschieden oder im Körper verbrannt worden.

II. Versuche an normalen Hunden.

1. Salicin subcutan.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäuren als $BaSO_4$	Salicylsäurereaktion	Der Harn dreht im 1 dcm-Rohr	Bemerkungen
21. März	10,2	353	0,1368			Nahrung: 200 g Pferdefleisch, 40 g Speck, Wass. Am 23. März 4 g Salicin subcutan.
22. „	10,0	352	0,1246			
23. „	10,0	448	0,1267			
24. „	10,0	310	0,4590	schwach	— 23′	
25. „	9,8	306	0,2068			
26. „	9,9	332	0,1674			

In der Vorperiode war die Menge der Ätherschwefelsäure durchschnittlich gleich 0,1294 g $BaSO_4$, die Zunahme am Tage der Salicindarreichung und dem folgenden Tage war gleich 0,5364 g $BaSO_4$, d. h.

Zunahme für 1 g Salicin = 0,1341 g $BaSO_4$
= 0,168 g Salicin.

Aus der Linksdrehung berechnet sich eine Ausscheidung von etwa 1,90 g unverändertem Salicin.

2. Salicin subcutan.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäuren als $BaSO_4$	Salicylsäurereaktion	Der Harn dreht in 1 dcm-Rohr	Bemerkungen
12. Mai	10,4	140	0,3111			Der Hund hungert vom 10. Mai ab.
13. „	10,3	85	0,3043			
14. „	10,2	80	0,3501			
15. „	10,1	94	0,6557	schwach	— 46′	Am 14. Mai 4 g Salicin subcutan.
16. „	10,0	80	0,2260	sehr schwach	— 10′	
17. „	10,0	80	0,2392			

Der Hund scheidet während dieser Hungerperiode vor der Salicindarreichung aus: Ätherschwefelsäuren im Tage durchschnittlich entsprechend 0,3218 g $BaSO_4$. Die Zunahme ist am Salicintage gleich 0,3339 g $BaSO_4$, also

Zunahme der Ätherschwefelsäuren für 1 g Salicin = 0,0835 g $BaSO_4$
= 0,1023 g Salicin.

Salicin wurde ausgeschieden am ersten Tage nach der Einspritzung 1,15 g, am zweiten Tage 0,26 g.

3. Salicin per os.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäure als $BaSO_4$	Salicylsäurereaktion	Der Harn dreht im 1 dcm-Rohr	Bemerkungen
29. März	9,7	525	0,1962			Futter: 200 g Pferdefl., 40 g Speck, Wassser.
30. „	9,8	405	0,2058			
31. „	9,9	440	1,1290	sehr stark	— 13′	
1. April	9,6	520	0,1184	schwach		Am 30. März 4 g Salicin per os.
2. „	9,5	540	0,0888			
3. „	9,9	695	0,0858			

Der Hund scheidet an Ätherschwefelsäuren aus in der Vorperiode im Tag 0,2010 g $BaSO_4$, Zunahme nach der Darreichung von Salicin = 0,8454 g $BaSO_4$.

Zunahme der Ätherschwefelsäuren für 1 g Salicin = 0,2113 g $BaSO_4$ = 0,259 g Salicin. Salicin wurde ausgeschieden 1,52 g.

Es war also auch beim Hunde nach der Eingabe per os die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuren eine größere als nach subcutaner Einspritzung.

Auffallend ist in diesen und einigen anderen Versuchen das Absinken der Ätherschwefelsäuren in der Periode nach der Salicindarreichung.

Stellen wir die Ergebnisse dieser Versuche zusammen, so ergibt sich für das Verhalten des Salicins bei normalen Kaninchen und Hunden folgendes:

Nach Darreichung von 4 g Salicin wurden im Harn ausgeschieden:

	unverändert	in Form von Saligeninätherschwefelsäure	im ganzen	
nach subcutaner Einspritzung .	1,81	0,313	2,12	Kaninchen
nach Aufnahme per os . . .	2,15	0,532	2,68	Kaninchen
nach subcutaner	1,90	0,672	2,62	Hund
Einspritzung	1,41	0,409	1,82	Hund
nach Aufnahme per os . . .	1,52	1,036	2,87	Hund

Von dem eingeführten Salicin wird, vorausgesetzt, daß die beobachtete Linksdrehung des Harns nur auf Salicin zu beziehen ist, ein sehr wesentlicher Bruchteil unverändert ausgeschieden, und zwar sowohl nach subcutaner Einspritzung, wie nach der Darreichung per os. In letzterem Falle erfolgt also die Resorption zum Teil eher, als das Salicin in den Bereich der Darmfäulnis gelangt.

Weiter wurden von dem im Salicin eingeführten Saligenin beim Kaninchen nach subcutaner Einspritzung 7,8%, nach Darreichung per os 13,3%, beim Hunde nach subcutaner Einspritzung 10,2 bzw. 16,8%, nach Darreichung per os 25,9% in Form von Ätherschwefelsäuren ausgeschieden.

Es wird also sowohl beim Kaninchen wie beim Hunde eine Menge von mindestens 10% des Salicins durch das

Emulsin der Gewebe zerlegt. Ein Minimalwert ist dies deshalb, weil ein Teil des Saligenins zu Salicylsäure oxydiert wird.

Nach der Einführung des Salicins vom Darm aus ist die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuren sowohl beim Hunde als auch beim Kaninchen größer als nach der subcutanen Einspritzung. Zu dem Saligenin, das durch die Fermentwirkung der Gewebe in Freiheit gesetzt wird, kommt noch dasjenige hinzu, das durch Spaltung im Darme entsteht.

III. Versuche an Hunden nach der Exstirpation des Pankreas.

1. Pankreasexstirpation ohne Diabetes. Salicin subcutan.

Voranschicken will ich einen Versuch, bei dem wir das Pankreas wie in anderen, diesen vorhergehenden Versuchen vollkommen herausgenommen zu haben glaubten, auch bei der Sektion keine Pankreasreste fanden, aber kein Zucker im Harn aufgetreten war. Als der Hund sich nach der Operation erholt hatte, zeigte er nur einen auffallenden Hunger und Durst. Es war derselbe Hund (II. 2.), dem vor der Operation während einer Hungerperiode Salicin subcutan eingespritzt worden war. Nach Beendigung der Hungerperiode war er gut gefüttert worden.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäuren als $BaSO_4$	Salicylsäurereaktion	Der Harn dreht im 1 dcm-Rohr	Bemerkungen
29. Mai	10,3					Pankreas herausgenommen am 28. Mai. Futter: 29. Mai 150 g Milch, an den folgenden Tagen 350 g Fleisch, 250 g Milch. Vom 2. Juni ab 400 g Fleisch u. 250 g Milch. Am 31. Mai 4 g Salicin subcutan
30. „	10,3	240	0,1728			
31. „	9,9	464	0,2044			
1. Juni	9,7	270	0,4034	sehr schwach	links 46′	
2. „	9,6	350	0,1092		„ 10′	
3. „	9,7	340	0,1006			
4. „	10,0	360	0,1109			

Die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuren nahm auch in diesem Versuche nach der subcutanen Einspritzung zu. Zieht man auch hier vom $BaSO_4$ des Salicintages den Mittelwert der beiden vorhergehenden Tage ab, so findet man eine Zunahme von 0,2148 g $BaSO_4$, also Zunahme der Ätherschwefelsäuren für 1 g Salicin = 0,0537 g $BaSO_4$ = 0,0657 g Salicin.

Auch hier wurde, wie unter normalen Verhältnissen, ein Teil des Salicins unverändert durch den Harn ausgeschieden.

2. Pankreasexstirpation. Diabetes. Salicin subcutan.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäuren als $BaSO_4$	Der Harn dreht im 1 dcm-Rohr rechts	Bemerkungen
20. April	12,4	595	0,1358	2° 27′	18. April Pankr. exstirpiert.
21. „	11,5	610	0,1686	2° 28′	D. Hund frißt fast gar nicht,
22. „	11,3	615	0,1107	1° 22′	trinkt sehr viel Wasser.
23. „	11,1	456	0,1512	1° 32′	Am 21. April 4,5 g Salicin subcutan. Nach dem Vergären und Klären durch Bleiacetat dreht der Harn am 22. April 15′, am 23. April 7′ nach links. Keine Reaktion auf Salicylsäure.

In diesem Versuche war nach der subcutanen Injektion von Salicin keine Vermehrung der Ätherschwefelsäuren eingetreten.

3. Pankreasexstirpation. Diabetes. Salicin subcutan.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäuren als $BaSO_4$	Der Harn dreht im 1 dcm-R. rechts	Bemerkungen
8. Juni	11,5	550	0,0759	2° 45′	Operation am 6. Juni.
9. „	11,0	530	0,0900	2° 33′	Der Hund frißt nicht, trinkt
10. „	10,5	530	0,2685	1° 48′	viel Wasser.
11. „	10,3	600	0,1296	+	9. und 12. Juni je 4 g
12. „	9,6	540	0,1850	+	Salicin subcutan. An dem
13. „	9,3	550	0,3495	1° 25′	der Injektion folgenden Tage beide Male schwache Salicylsäurereaktion. Nach dem Vergären dreht der Harn vom 10. Juni — 20′, der vom 13. Juni — 8′.

Ziehen wir von der Summe der am 10. und 11. Juni ausgeschiedenen Ätherschwefelsäuren den Durchschnitt der beiden vorhergehenden Tage ab, so ergibt sich eine Zunahme von 0,3152 g $BaSO_4$, d. h.:

Zunahme der Ätherschwefelsäuren für 1 g Salicin = 0,0788 g $BaSO_4$ = 0,0967 g Salicin.

Auch nach der zweiten Injektion nimmt die Menge der Ätherschwefelsäuren zu. Die verhältnismäßig hohen Zahlen am 12. und 13. Juni waren wahrscheinlich die Folge einer Darmabknickung, die bei der Sektion festgestellt wurde. Der Dünndarm war an einer Stelle mit der Operationsnarbe verwachsen und undurchgängig.

4. Pankreasexstirpation. Diabetes. Salicin subcutan.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäuren als $BaSO_4$	Der Harn dreht rechts im 1 dcm-R.	Bemerkungen
28. Juni	9,0	470	0,2409	2° 2′	Operation: 26. Juni. Frißt
29. „	8,8	340	0,0603		am 27. Juni 130 g Pferde-
30. „	8,5	340	0,1800	1° 48′	fleisch, am 28. Juni ?
1. Juli	8,4	130	0,0979	1° 55′	am 29. Juni Injektion von 4 g Salicin.

Im Vergleich zum Tage vor und nach der Operation ist eine deutliche Zunahme der Ätherschwefelsäuren vorhanden. Der etwas höhere Wert am 28. Juni hängt vielleicht damit zusammen, daß als Antiseptikum bei der Operation Carbolsäure verwendet worden war, von der etwas zur Resorption gelangt und noch nicht vollständig ausgeschieden war. Beziehen wir die Zunahme auf den Tag vor der Operation, so entspricht sie 0,1200 g $BaSO_4$, d. h.: Zunahme der Ätherschwefelsäuren für 1 g injiziertes Salicin 0,0300 g $BaSO_4$ = 0,0374 g Salicin.

5. Pankreasexstirpation. Diabetes. Salicin subkutan.

Datum 1907	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäuren als $BaSO_4$	Zucker ausgeschieden	Bemerkungen
9. März	11,0	650	0,1696	22,2 g	Operation: 6. März. Der
10. „	10,5	715	0,1450	38,6 „	Hund frißt nicht, aber säuft
11. „	9,7	970	0,1747	37,4 „	viel Wasser. 10. März 4 g
12. „	9,5	730	0,1155	23,5 „	Salicin subcutan. 11. März. keine Eisenchloridreaktion.

Die Zunahme der Ätherschwefelsäuren ist nur eine sehr geringe. Sie beträgt im Vergleich zum Mittel der beiden der Salicininjektion vorhergehenden Tage nur 0,0172 g $BaSO_4$, d. h. Zunahme der Ätherschwefelsäuren für 1 g injiziertes Salicin 0,0043 g $BaSO_4$ = 0,0057 g Salicin.

6. Pankreasexstirpation. Diabetes. Salicin bzw. Saligenin subcutan.

Datum 1908	Körpergewicht kg	Harnmenge	Ätherschwefelsäure als $BaSO_4$	Zucker ausgeschieden g	Bemerkungen
21. März	8,2	305	0,1280	27,2	Operation: 19. März. In den ersten Tagen frißt der Hund nicht. Am 23. März frißt er 300 g an den folgenden Tagen 400 g Pferdefleisch. 22. März: 3 g Salicin subcutan. 26. März 1,5 g Saligenin subcutan. Am Tage nach der Saligenininjektion färbt sich der Harn mit Eisenchlorid stark blaurot, am folgenden Tage nur noch sehr schwach.
22. „	8,0	265	0,1579	22,1	
23. „	7,9	325	0,2852	22,9	
24. „	7,8	450	0,1995	34,8	
25. „	7,6	550	0,2373	40,3	
26. „	7,4	440	0,2353	35,1	
27. „	7,2	475	0,8954	37,4	
28. „	7,2	525	0,4486	30,4	
29. „	7,0	440	0,1798	38,4	
30. „	6,8				
31. „	6,7				

In diesem Versuche ist die Zunahme der Ätherschwefelsäuren eine sehr deutliche, aber doch klein im Verhältnis zur Zunahme nach Injektion der gleichwertigen Menge Saligenin.

Die Zunahme nach der Salicininjektion entspricht im Vergleich zum Mittel der beiden der Salicininjektion vorhergehenden Tage 0,1423 g $BaSO_4$, also Zunahme der Ätherschwefelsäuren für 1 g injiziertes Salicin 0,0474 g $BaSO_4$ = 0,0592 g Salicin.

Nach der Injektion von Saligenin betrug die Zunahme, wenn man die beiden der Injektion folgenden Tage mit den beiden ihr vorhergehenden vergleicht, 1,108 g $BaSO_4$. Sie ist also eine bei weitem größere als nach Injektion von Salicin. Im übrigen wird auch von dem injizierten Saligenin nur ein Teil an Schwefelsäure gebunden. 1,108 g $BaSO_4$ entsprechen 0,523 g Saligenin. An Schwefelsäure gebunden wurden also $0{,}523 \times 100 : 1{,}5$, d. h. etwa 35 %, der Rest wird teils zu Salicyl-

säure oxydiert, teils wohl auch unverändert ausgeschieden [s. K. Omi (S. 258)].

Welche Schlüsse lassen sich aus den Versuchen am pankreaslosen Hund ziehen?

Zunächst zeigt uns der Saligeninversuch, daß auch nach der Exstirpation des Pankreas in ausgiebigem Masse eine Bildung von Ätherschwefelsäuren stattfindet. Diese Synthese wird also durch den Diabetes anscheinend nicht wesentlich beeinträchtigt.

Die Zunahme der Ätherschwefelsäuren nach der subcutanen Injektion von Salicin zeigt bei den diabetischen Hunden bedeutende Schwankungen. In einem Versuche war sie überhaupt nicht nachweisbar, in einem anderen äußerst gering, in den übrigen aber sehr deutlich vorhanden.

Die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuren, ausgedrückt in Grammen Bariumsulfat betrug für 1 g unter die Haut gespritztes Salicin.

Datum	Körpergewicht des Hundes	$BaSO_4$ g	
21. März 1907	10 Kilo	0,1341	normal
12. „ „	10,1 „	0,0835	
29. „ „	9,7 „	0,0537	
21. „ 1908	7,9 „	0,0474	Nach Herausnahme des Pankreas.
8. Juni 1907	10,5 „	0,0788	
28. „ „	8,5 „	0,0300	
29. Mai „	9,7 „	0,0537	
29. März „	10,5 „	0,0043	
20. April „	11,3 „	—	

Die Zunahmen beweisen, daß der Organismus auch nach der Pankreasexstirpation meist noch die Fähigkeit der Glykosidspaltung besitzt. Berücksichtigt man aber die Größe der Zunahme, welche die Ätherschwefelsäuren nach Salicineinspritzung beim pankreaslosen Hunde zeigen, so scheint auch hier die Glykosidspaltung durch die Pankreasexstirpation beeinträchtigt zu werden. Nach der Beobachtung von Kaoru Omi, welcher die Glykosidspaltung im Leberextrakt des pankreaslosen Hundes größer als beim normalen fand, hätte man das Gegenteil erwarten sollen.

Das Verhalten der Glykoside — und der gepaarten Glykusonsäuren — im Körper des normalen und pankreaslosen Hundes erscheint also weiterer Untersuchung wert.

Über das Vorkommen der Antikatalase im Tierorganismus.

Bemerkung zur Mitteilung von H. de Waele und A. J. J. Vandevelde.

Von

F. Battelli und Lina Stern.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Genf.)

(Eingegangen am 30. April 1908.)

Unter dem Titel: „Läßt sich das Bestehen einer Antikatalase nachweisen?" veröffentlichten vor kurzem H. de Waele und A. J. J. Vandevelde in dieser Zeitschr. **8**, 264 bis 275 eine Arbeit, worin sie auf Grund ihrer Untersuchungen das Bestehen einer Antikatalase verneinen. Sie erklären, daß die Ergebnisse ihrer Untersuchungen mit den unseren nicht übereinstimmen.

Wir wollen hier darauf aufmerksam machen, daß die Versuche der genannten Forscher in keinem Zusammenhange mit den unseren stehen.

Wir hatten mit dem Namen Antikatalase eine Substanz bezeichnet, die in verschiedenen tierischen Geweben vorkommt und sich leicht extrahieren läßt. Diese Substanz oder vielmehr der die Substanz enthaltende Gewebsauszug vermag Katalaselösungen mehr oder weniger stark zu inaktivieren, ohne dieselben jedoch völlig zu zerstören.

Auf die Eigentümlichkeiten dieses Körpers wollen wir hier nicht näher eingehen. Wir verweisen auf unsere diesbezüglichen Mitteilungen (Compt. rend. Biol. **58**, 235 bis 237 und 758 bis 760, 1905) sowie auf unsere ausführliche Arbeit (Journal de Physiol. et de Pathol. générale **7**, 919 bis 935 und 957 bis 973).

In vielen Beziehungen verhält sich die Antikatalase wie das schwefelsaure Eisenoxydul (Compt. rend. Biol. 59, 521, 1905).

Wir haben der Substanz die Bezeichnung Antikatalase gegeben, um ihre spezifische Wirkung auf die Katalase anzudeuten, im selben Sinne wie Antitrypsin und Antipepsin Substanzen bezeichnen, die auf die betr. Fermente spezifisch einwirken. Wir haben keineswegs diesen Körper als einen Antikörper im Sinne der Immunitätslehre auffassen wollen.

Zum Schlusse noch die Bemerkung, daß die obengenannten Verfasser von unseren verschiedenen Mitteilungen sowie von unserer ausführlichen Arbeit keine Kenntnis besitzen. Wir wollen sie hiermit auf dieselben hinweisen.

Zur Frage des Albumosegehaltes des Gesamtblutes, des Plasmas und des Serums.

Von

Emil Abderhalden.

(Eingegangen am 4. Mai 1908.)

Es liegt mir fern, nochmals die ganze Frage nach dem Vorkommen von Albumosen im Gesamtblute, im Plasma und im Serum aufzurollen. Ich habe meiner jüngsten Mitteilung[1]) nichts beizufügen. Es seien mir nur einige Worte gestattet, um die Art, wie Freund wiederum in seiner letzten[2]) Entgegnung vorgeht, zu charakterisieren. Folgender Tatbestand liegt vor. Meine Mitarbeiter und ich haben mit verschiedenen Methoden im Plasma des Blutes keine Albumosen nachweisen können, oder genauer ausgedrückt: Nach der vollständigen Enteiweißung gab das Filtrat keine Biuretreaktion und auch nicht die üblichen Reaktionen auf Albumosen. Genau dasselbe Resultat erhielten andere Forscher und vor allem Morawitz und Dietschy. Statt, daß nun Freund zugibt, einen Irrtum begangen zu haben, als er die Arbeit von Morawitz und Dietschy den Arbeiten meiner Mitarbeiter und mir entgegenstellte,[3]) setzt er seine von ihm ausgegangene Polemik unentwegt fort. Ich sage ausdrücklich „Polemik", denn der erste Angriff Freunds ging bereits in Form und Art über den Rahmen einer einfachen Kritik hinaus. In der Tat liegen die Verhältnisse nun

[1]) Zur Frage des Albumosengehaltes des Blutes und speziell des Plasmas. Diese Zeitschr. 8, 360, 1908.

[2]) Zur Frage des Albumosengehaltes des Blutes. Diese Zeitschr. 9, 463, 1908.

[3]) Zur Frage des Albumosengehaltes des Blutes. Diese Zeitschr. 7, 361, 1908.

so: Morawitz und Dietschy erhielten albumosenartige Stoffe bei der Enteiweißung dann, wenn sie Gesamtblut anwandten, sie vermißten diese Stoffe, wenn sie Plasma enteiweißten. Diese Beobachtung machte die genannten Autoren stutzig, und sie betonen ausdrücklich: „Es ergibt sich also hieraus, daß die bei Verarbeitung von Blut erhaltenen, nicht koagulierten eiweißähnlichen Substanzen nicht dem Plasma, sondern den Blutkörperchen entstammten. Wir sind geneigt, die Reaktion auf nicht koaguliertes Globin resp. Hämoglobin zu beziehen usw." Klarer und deutlicher kann man den Standpunkt der Autoren Morawitz und Dietschy nicht kennzeichnen, und ich glaube kaum, daß jemand es wagen wird, zu behaupten, daß die Ausführungen der genannten Autoren auch nur den leisesten Irrtum zulassen. Nun scheint mir ein Punkt von der allergrößten Wichtigkeit zu sein, auf den ich schon in der letzten Entgegnung an Freund klar und deutlich hingewiesen habe. Man muß einstweilen, bis die ganze, so unendlich schwierige Frage klar entschieden ist, unterscheiden zwischen Autoren, die Albumosen im Gesamtblute gesucht haben, und solchen, die Plasma verwendeten. Die Notwendigkeit einer solchen Unterscheidung ergibt sich in allererster Linie aus der Arbeit von Morawitz und Dietschy[1]). Freund wäre unzweifelhaft verpflichtet gewesen, als er seine erste gegen mich gerichtete Arbeit veröffentlichte, genau festzustellen, ob die Autoren, die Albumosenbefunde verzeichnen, unter ganz gleichen Bedingungen gearbeitet haben, wie meine Mitarbeiter und ich. Er hätte dann gefunden, daß in bezug auf den Albumosengehalt des Plasmas eben Morawitz und Dietschy genau dieselbe Beobachtung gemacht haben, wie meine Mitarbeiter und ich. Wir haben nur mit Plasma und Serum gearbeitet und kommen also bei der Frage nach dem Albumosengehalte des Gesamtblutes gar nicht in Betracht. Embden und Knoop[2]) haben mit Gesamtblut gearbeitet. Sie geben als Schlußfolgerung

---

[1]) P. Morawitz und R. Dietschy, Über Albumosurie, nebst Bemerkungen über das Vorkommen von Albumosen im Blut. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 54, 88, 1905.

[2]) Gustav Embden und Franz Knoop, Über das Verhalten der Albumosen in der Darmwand und über das Vorkommen von Albumosen im Blute. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 120, 1902.

an: „Im Blute finden sich allem Anscheine nach häufig Albumosen vor." Im experimentellen Teil der Arbeit dieser Autoren ist ausdrücklich angegeben, daß Blut und nicht etwa Plasma enteiweißt wurde. Bergmann und Langstein[1]) verwendeten bei ihrem Hauptversuch ebenfalls Gesamtblut (S. 34 ihrer Arbeit).[2])

Vor Jahresfrist hat Ch. Inagaki[3]) die folgende interessante Beobachtung veröffentlicht: „Das Nucleohiston verbindet sich mit Albumosen salzartig, solange es in freiem oder dissoziertem Zustande ist, woraus folgt, daß die im Körper selbst gebildeten oder künstlich in den Blutkreislauf hineingebrachten Albumosen von den Zellsubstanzen aufgenommen und fixiert werden können." Im Blutplasma konnte ein solches Verhalten nicht festgestellt werden. Mir scheint diese Beobachtung von großer Wichtigkeit zu sein, und sie ist vielleicht berufen, aufzuklären, weshalb Forscher, die Gesamtblut koagulieren, albumosenartige Körper beobachten, und solche, die die Blutkörperchen sorgfältig entfernen, zu einem negativen Befunde kommen können. Das ganze Problem muß jedenfalls unter Berücksichtigung dieser Erfahrungen weiter bearbeitet werden. Ich bin nach dieser Richtung mit Untersuchungen beschäftigt.

Ich bitte, diesen einfachen klaren Sachverhalt mit den Auslassungen Freunds zu vergleichen. Ich muß meinen Vorwurf, daß Freund die Resultate der Autoren Morawitz und Dietschy in genau entgegengesetztem Sinne dem Leser vorgeführt hat, vollinhaltlich aufrecht erhalten. Der Leser mußte durch die Darstellung Freunds den Eindruck gewinnen, als stünde ich mit den Resultaten meiner Arbeiten auf diesem

---

[1]) Gustav von Bergmann und Leo Langstein, Über die Bedeutung des Reststickstoffs des Blutes für den Eiweißstoffwechsel unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 27, 1904.

[2]) Leo Langstein (Über das Vorkommen von Albumosen im Blute. Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 3, 373, 1902) berichtet über Albumosenbefunde im Pferdeblutserum. Auch wir haben im Serum ab und zu „Albumosen" gefunden. Es sei dies der Vollständigkeit wegen erwähnt. Wir haben bereits in der letzten Mitteilung darauf hingewiesen, daß „Albumosenbefunde" im Serum nicht eindeutig sind.

[3]) Ch. Inagaki, Über den chemischen Mechanismus der Eiweißassimilation. Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 449, 1907.

Gebiete einsam auf weiter Flur. Er verschwieg auch, daß außer Morawitz und Dietschy andere Autoren mit mir gleicher Ansicht sind, wobei zu bemerken ist, daß alle Forscher, die auf diesem schwierigen Gebiete arbeiteten, sich gehütet haben, negativen Befunden allzu großes Gewicht beizulegen. Stets ist betont worden, Eiweißabbauprodukte sind bisher einwandsfrei im Plasma nicht gefunden, trotzdem ist die Möglichkeit zuzugeben, daß solche in so kleinen Mengen vorhanden waren, daß sie dem Nachweis entgingen.

Freund gibt auch jetzt bei dem ganz klaren Tatbestande, und nachdem Morawitz selbst erklärt hat, daß er mit Oppenheimer und mir in seinen Resultaten vollständig übereinstimmt, nicht zu, daß er einen Irrtum begangen hat, sondern er hebt hervor, daß auch ein anderer Autor, Borchardt[1]), die Arbeit von Morawitz und Dietschy in gleichem Sinne verwertet habe, wie er. Das ist nun richtig. Borchardt hebt hervor, daß die Frage nach dem Albumosengehalt im Blute noch unentschieden sei, und erwähnt dann Morawitz und Dietschy unter den Autoren, die wenigstens in einer Anzahl von Fällen im Filtrate des Eiweißniederschlages Albumosen nachgewiesen haben. Selbstverständlich ist Borchardt hier ein Irrtum untergelaufen. Der große Unterschied zwischen der Arbeit von Borchardt und von Freunds Polemik liegt jedoch darin, daß ersterer in einer das Problem der Albumosen berührenden, sehr wichtigen Arbeit gewissermaßen nebenbei die bisher vorliegenden Untersuchungen über Albumosen im Blute streift. Es ist gewiß verzeihlich, wenn hierbei ein Irrtum mit unterlaufen ist. Ganz anders liegt die Sache bei Freund. Freund hat in sehr temperamentvoller Weise meine Arbeiten und die meiner Mitarbeiter angegriffen, und schließlich seine Einwände zu einer eigenen Arbeit zusammengefaßt. Er teilt die Forscher, die über Albumosen gearbeitet haben, in zwei Lager und behauptet, ich wäre der einzige, der Albumosen im Blute nicht gefunden hat. Freund hat mich und meine Mitarbeiter angegriffen. Für ihn war es erste Pflicht und Schuldig-

---

[1]) L. Borchardt, Über die Assimilationsweise der Elastinalbumosen. (Ein Beitrag zur Frage nach dem Schicksal der Eiweißkörper im Blute.) Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**, 506, 1907.

keit, die Literatur genau zu studieren und unrichtige Angaben zu vermeiden. Er hätte ohne Zweifel der Wahrheit mehr genützt, wenn er entweder neue Tatsachen beigebracht, oder aber unumwunden erklärt hätte, daß ihm ein großer Irrtum unterlaufen ist, und er die Resultate der Arbeit von Morawitz und Dietschy in entgegengesetztem Sinne verwertet hat. Ich kann auch hier nicht umhin, noch einmal deutlich hervorzuheben, daß Borchardt und Freund nicht deshalb in gleichem Sinne zitiert haben, weil etwa die Arbeit von Morawitz und Dietschy unklar gehalten ist. Ich habe auf diesen Punkt schon hingewiesen. Auch Lüthje[1]) zitiert in einer eben erschienenen Arbeit ganz eindeutig Morawitz und Dietschy als Forscher, die wie meine Mitarbeiter und ich keine Albumosen im Blute nachweisen konnten.

Nun noch eine letzte Bemerkung. Auf Seite 362 seiner ersten Polemik betont Ernst Freund folgendes: „Den negativen Befunden Abderhaldens stehen positive von sechs Autoren gegenüber: Embden und Knoop, Langstein, v. Bergmann und Langstein, Morawitz und Dietschy, F. Kraus und Freund." Am Schlusse seiner Arbeit S. 368 schreibt Freund: „Es bleibt unverständlich, daß Abderhalden bei seiner mangelhaften Methodik sich berechtigt glaubt, Angaben, die mit unanfechtbaren Methoden gemacht sind, nicht zu berücksichtigen." Ferner: „Sieben Autoren haben mit einwandfreien Methoden geringe Mengen von Albumosen im Blute nachgewiesen usw." Nun fordert mich Freund (S. 466) in seiner neuen Polemik auf, die Stelle nachzuweisen, an der er die Methodik von Morawitz und Dietschy als einwandfrei bezeichnet hat! Freund schreibt: „Ich fordere Abderhalden auf, mir jene Stelle in irgend einer Arbeit von mir zu zitieren, wo ich die Methode von Morawitz und Dietschy „als vollständig einwandfrei" anerkenne." „Wenn er, wie ich sicher weiß, diese Stelle nie finden wird usw."

Ich verweise auf die oben genannten drei Stellen der ersten Polemik. Unter den sieben Autoren, die mit einwandfreien Methoden, wie Freund hervorhebt, gearbeitet haben,

---

[1]) Hugo Lüthje, Die Eiweißregeneration im tierischen Körper. Ergebnisse der Physiologie (Asher und Spiro) **7**, 795 (735). 1908.

sind auch Moranitz und Dietschy gemeint, darüber besteht gar kein Zweifel. Wenn erst jetzt Freund, nachdem er durch mich und Morawitz darüber belehrt worden ist, daß er die Resultate der Arbeit von Morawitz und Dietschy unrichtig wiedergegeben hat, die Fehlerquellen der von den genannten Autoren angewandten Methoden hervorhebt, so spricht das wohl für sich selbst. Übrigens ist die betreffende Methode zur Enteiweißung auf einen Vorschlag von Hofmeister zurückzuführen (vgl. S. 91 der Arbeit von Morawitz und Dietschy).

Es wird mir niemand bei aufmerksamer Lektüre meiner letzten Erwiderung und den Angriffen Freunds verargen, wenn ich an dieser Stelle meine Auseinandersetzungen mit Freund abbreche und nur betone, daß seine weiteren Behauptungen ebenso haltlos sind, wie die bis jetzt kurz erwähnten. In der Tat hat Freund auch nicht den geringsten sachlich begründeten Einwand gegen die von meinen Mitarbeitern und mir angeführten Untersuchungen über den Albumosengehalt des Plasmas vorgebracht, und ebenso ist es Freund nicht gelungen, meine gegen seine erste Polemik beigebrachten Einwände auch nur im geringsten zu entkräften. Ich hoffe, durch weitere unbefangene Untersuchungen neues Material gewinnen zu können, um in das so wichtige Problem der Resorption und Assimilation der Proteine und ihrer Abbaustufen mehr Klarheit zu bringen, als es tatsächlich jetzt der Fall ist. Gleichzeitig erkläre ich für meinen Teil, daß ich auf Angriffe Freunds in dieser Sache nicht mehr eingehen werde.

Die Adsorptionsanalyse der Fermente.

Von

Leonor Michaelis, Berlin, und **M. Ehrenreich**, Bad Kissingen.

(Aus dem biologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban zu Berlin.)

(Eingegangen am 29. April 1908.)

Im Anschluß an die Beobachtungen des einen von uns[1]) über die Adsorbierbarkeit des Invertins durch verschiedenartige, unspezifische Adsorbentien schien es uns angebracht, die Frage der unspezifischen Adsorption der verschiedenen Fermente systematisch zu untersuchen. Die Tatsache, daß Fermente nicht nur von ihrem spezifischen Substrat, sondern auch von anderen, adsorptionstüchtigen Stoffen adsorbiert werden, ist von alters her bekannt, und auf dieser Tatsache beruhen viele Bemühungen zur Reinigung von Fermenten von ihren Beimengungen, die schon v. Bruecke angegeben hat. Bemerkenswert sind in dieser Beziehung die Untersuchungen von Hedin[2]) aus jüngster Zeit. Die Adsorption durch spezifische Substrate hat der eine von uns[3]) zur Trennung von Fermentgemischen anzuwenden versucht. Aber es fehlen systematische Untersuchungen über den Einfluß der Natur des Adsorbens auf den Sinn und die Größe der Adsorption für verschiedene Fermente, auch ist noch kein Versuch gemacht worden, aus der Art der Adsorbierbarkeit eines Fermentes Schlüsse auf seine chemische oder elektrochemische Natur zu ziehen.

Bevor wir aber auf den experimentellen Teil unserer Arbeit

---

[1]) Michaelis, diese Zeitschr. 7, 488, 1908.

[2]) Hedin, S. G., Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 497, 1907.

[3]) Ehrenreich, Boas Arch. f. Verdauungskrankh. 9, 3 u. 4.

eingehen, müssen wir einige allgemeine Bemerkungen über die Adsorption überhaupt vorausschicken. Erst kürzlich ist eine eingehende Studie über die Adsorption von Freundlich[1]) erschienen, in der er sich auch über das Wesen der Adsorption äußert. Unter Zugrundelegung einiger älterer Anschauungen kommt Freundlich zu seiner Auffassung, daß immer dann eine Adsorption eines gelösten Körpers eintreten muß, wenn dadurch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit gegen das Adsorbens vermindert wird. Freundlich schließt also andere Erscheinungen als reine Oberflächenspannung aus dem Bereich seiner Erwägungen aus. Dieser Gedankengang führte ihn zur Aufstellung des auch experimentell von ihm geprüften Satzes: wenn man die verschiedenen adsorbierbaren Substanzen gemäß ihrer Adsorbierbarkeit für ein Adsorbens in eine Reihe ordnet, so gilt diese Reihe auch in der Regel für andere Adsorbentien. Dieser Satz verliert aber an allgemeiner Gültigkeit, wenn man in der Auswahl der verschiedenen Adsorbentien weiter geht, als Freundlich es getan hat. Dieser arbeitete mit verschiedenen Kohlearten, ferner mit Cellulose, Wolle, Seide. Wäre die Freundlichsche Regel in allen Fallen gültig, so gäbe es z. B. keine elektive Färbung. Außerdem wird der experimentelle Teil unserer Arbeit zeigen, daß die einzelnen Fermente sich gegen die verschiedenen Adsorbentien grundverschieden verhalten und daß die Adsorbierbarkeit einer Substanz noch von anderen Dingen abhängen muß.

Zur Erläuterung dieser Behauptung folge jetzt der experimentelle Teil unserer Arbeit. Wir wählten für unsere Versuche folgende Fermente: Speicheldiastase in Form von frischem Speichel, pflanzliche Diastase aus Malz als käufliches Pulver (Grübler), Invertin in Form von Schüttelextrakt aus Bäckerhefe (vgl. Michaelis, l. c.) Pepsin (P. „in lamellis", Merck) Trypsin (Pankreatin. absolut., Rhenania), Labpulver.

Es wurde das Verhalten der Fermente gegen folgende Adsorbentien geprüft: Kaolin, Talcum, Tierkohle, Tonerde und Eisenhydroxyd. Kaolin und Talkum sind als Handelspräparate von genügender Reinheit, als Kohle verwandten wir teils eine gewöhnliche Knochenkohle, teils „Blutkohle" von Merck,

[1]) H. Freundlich, Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 385, 1907.

wobei unsere Blutkohle etwa den doppelten Effekt hatte als die Knochenkohle sowohl in bezug auf die Adsorptionstüchtigkeit wie in bezug auf die Menge des zurückgehaltenen Wassers. Die Tonerde stellt man sich am besten dar, indem Aluminiumchlorid mit einem Überschuß von Ammoniak versetzt und mit destilliertem Wasser in der Zentrifuge bis zum völligen Verschwinden der alkalischen Reaktion gewaschen wird. Das erfordert sehr häufiges Waschen. Die genügende Reinheit der Tonerde von NH_3 erkennt man daran, daß zum Schluß auch nach kräftigem Centrifugieren über dem Bodensatz eine milchige Flüssigkeit zurückbleibt. Das Eisenhydroxyd wurde in Form der kolloidalen Lösung, „Ferrum oxydatum dialysatum", verwendet, wobei in einem Vorversuch jedesmal festgestellt wurde, wieviel Eisenlösung zuzusetzen war, um einen maximalen Niederschlag und gleichzeitig ein eisenfreies Filtrat zu bekommen. In einem Überschuß von Eisen lösen sich die Fällungen nämlich wieder.

Die Versuche fielen folgendermaßen aus:

A. Pflanzliche Diastase.

Zu allen Versuchen wurde verwendet eine 3 %ige Lösung, von der abgemessene Mengen mit in allen Versuchen gleich bemessenen Gewichtsmengen des Absorbens durchgeschüttelt wurden, und zwar sowohl bei neutraler als alkalischer und saurer Reaktion. Die Stärke der Acidität beziehungsweise Alkalinität wurde nach Maßgabe von Vorversuchen derartig gewählt, daß eine erhebliche Schädigung des Fermentes vermieden wurde.

1. Pflanzendiastase-Kaolin.

Es wurden gemischt:

A.	Diastaselösung	20 ccm	+	H_2O	2 ccm	+	Kaolin	8 g	
B.	„	20 „	+	„	2 „	+	„	0 „	(Kontrolle)
C.	„	20 „	+	$^n/_{10}$-NaOH	2 ccm	+	Kaolin	8 g	
D.	„	20 „	+	„	„	2 „	+	„	0 „ (Kontrolle)
E.	„	20 „	+	$^n/_{10}$-HCl	2 „	+	„	8 „	
F.	„	20 „	+	„	„	2 „	+	„	0 „ (Kontrolle)

A, C und E wurde filtriert, darauf Filtrate und Kontrollen genau neutralisiert und sodann folgender Versuch bei 37° C im Wasserbad angesetzt:

	Auf Jodzusatz farblos nach:
1. Filtrat von A 2 ccm + 1 %ige Stärkelösung 2 ccm	13′
2. Kontrolle B 2 „ + „ „ 2 „	13′
3. Filtrat von C 2 „ + „ „ 2 „	18′
4. Kontrolle D 2 „ + „ „ 2 „	16′
5. Filtrat von E 2 „ + „ „ 2 „	∞′
6. Kontrolle F 2 „ + „ „ 2 „	14′

Der Zeitpunkt des Verschwindens der Blau- resp. Rotfärbung bei Jodzusatz wurde festgestellt, indem aus dem Probierröhrchen von Zeit zu Zeit Proben von 0,5 ccm entnommen und mit 0,5 ccm einer etwa 20 fach verdünnten Lugolschen Lösung versetzt wurden. Dabei ergab sich also, daß bei der neutralen und alkalischen Diastaselösung Versuch und Kontrolle in gleicher Zeit beendet waren (die Differenzen von wenigen Minuten liegen innerhalb der Fehlerquellen), daß dagegen bei der sauren Lösung auch nach Stunden keinerlei Fermentwirkung mehr eintrat, also alles Ferment vom Kaolin adsorbiert worden war.

Als Resultat dieses Versuches ergibt sich also:

Pflanzendiastase wird von Kaolin in neutraler und alkalischer Lösung gar nicht, in saurer Lösung dagegen komplett adsorbiert.

2. Pflanzendiastase-Talcum.

Je 20 ccm einer 3 % Diastaselösung werden bei neutraler, resp. schwach essigsaurer, resp. schwach soda-alkal. Reaktion mit je 10 g Talcum geschüttelt. Beim darauffolgenden Zentrifugieren setzt sich eine klare farblose Flüssigkeit in allen drei Proben ab, die ihre ursprüngliche Reaktion nicht verändert hat. Jetzt wurden alle drei Proben minimal essigsauer gemacht und nebst drei entsprechenden Kontrollen je 2 ccm Ferment mit 2 ccm einer 1 %igen Stärkelösung versetzt. Der Versuch präsentiert sich demnach folgendermaßen.

1. neutrales Talcumfiltrat	2 ccm	+	Stärke	2 ccm
2. alkalisches „	2 „	+	„	2 „
3. saures „	2 „	+	„	2 „
4. neutrales Ferment unbehandelt	2 „	+	„	2 „
5. alkalisches „ „	2 „	+	„	2 „
6. saures „ „	2 „	+	„	2 „

Sämtliche Röhrchen zeigen nach ca. 10 Minuten keine Blaufärbung mehr bei Jodzusatz.

Pflanzliche Diastase wird von Talcum auch nicht spurweise adsorbiert, weder bei saurer, noch neutraler, noch alkalischer Reaktion.

3. Pflanzendiastase-Kohle.

Schüttelt man 20 ccm einer neutralen oder schwach essigsauren 3% Diastaselösung mit je 3 g Blutkohle, so zeigen die Filtrate keine Spur einer Fermentwirkung mehr. Dagegen gelingt es bei alkalischer Reaktion der Fermentlösung, eine Adsorption des Ferments fast vollständig zu verhindern trotz Zusatz derselben Kohlenmenge. Der dazu nötige Grad von Alkalinität muß jedoch ausprobiert werden. Für unsere Fermentlösung lag das Optimum, bei dem das Ferment nahezu quantitativ durchging, bei Zusatz von 2 ccm einer $^n/_{10}$-NaOH-Lösung zu 15 ccm Diastaselösung. Setzte man mehr oder weniger Alkali zu, so trat teilweise Adsorption ein.

Hier das Resultat eines Versuches:

A.	Diastaselösung	15 ccm	+ $^n/_{10}$-NaOH	2 ccm	+	Blutkohle	2,25 g
B.	„	15 „	+ $^n/_{10}$-HCl	2 „	+	„	2,25 g
C.	„	15 „	+ H_2O	2 „	+	„	2,25 g

Die Filtrate sowie, drei entsprechende, jedoch nicht mit Kohle vorbehandelte Kontrollen werden alle ganz schwach essigsauer gemacht und der Fermentgehalt der einzelnen Flüssigkeiten wie oben angegeben ermittelt. Dabei ergibt sich:

Vollständige Farblosigkeit auf Jodzusatz bei

Filtrat von A	nach	30′
entspr. Kontrolle	„	30′
Filtrat von B	„	∞′
entspr. Kontrolle	„	8′
Filtrat von C	„	∞′
entspr. Kontrolle	„	8′

Es ist also bei der neutralen und sauren Lösung alles Ferment von der Kohle zurückgehalten worden, dagegen in der alkalischen Lösung die gleiche Menge Ferment, wie in der entsprechenden Kontrolle, mithin nichts adsorbiert worden, wobei allerdings eine leichte Schädigung des Ferments durch das Alkali eingetreten zu sein scheint. Bemerkenswert ist noch, daß unser Ferment am besten bei schwach saurer Reaktion wirkte, dagegen selbst bei spurweise alkalischer Reaktion unwirksam blieb, trotzdem aber relativ große Mengen von Alkali ohne Schädigung vertrug, sowie daß das Optimum der Alkalinität, bei dem kein Ferment adsorbiert wird, durchaus nicht dem Maximum von Alkali entspricht, das die Diastase ohne Schädigung ertragen kann, was sich bei vielen Versuchen ergab.

Als Resultat dieses Versuches ist also festgestellt:

Pflanzliche Diastase wird von Kohle in alkalischer Lösung von einem genau bestimmbaren Grade gar nicht, in neutraler und saurer Lösung jedoch quantitativ adsorbiert.

4. Pflanzendiastase-Thonerde.

Je 10 ccm 3%iger Fermentlösung werden versetzt:

A. mit 10 ccm Original-Thonerdesuspension,

B. mit 2 ccm $^n/_{10}$-NaOH + 10 ccm Thonerde,

C. mit 2 ccm $^n/_5$-Essigsäure + 10 ccm Thonerde.

Zu allen drei Versuchen werden entsprechende Kontrollen, mit Wasser an Stelle der Thonerdesuspension, angesetzt.

Nach dem Filtrieren wird alles genau neutralisiert (die Thonerdefiltrate sind, auch in B und C, an sich beinahe neutral geworden).[1])

Von allen Flüssigkeiten wird 1 ccm mit 3 ccm 1% löslicher Stärkelösung versetzt. Bei 41° sind entnommene Proben bei Jodzusatz gerade entfärbt:

bei A. in ∞ Minuten
Kontrolle dazu 20 „
bei B. in ∞ „
Kontrolle dazu 19 „

	entfärbt:	rein rot auf Jodzusatz:
bei C. in	> 5 Stunden	in 220 Minuten
Kontrolle dazu	19 Minuten	in 10 „

Resultat: Pflanzendiastase wird von Thonerde bei neutraler und alkalischer Reaktion vollkommen, bei saurer Reaktion unter sonst gleichen Bedingungen unvollkommen adsorbiert.

B. Speicheldiastase.

Zu diesen Versuchen wurde verdünnter menschlicher Speichel verwandt, der sich als stark wirksam erwies. Die Prüfung des Fermentgehaltes wurde in genau derselben Weise vorgenommen wie bei der Pflanzendiastase.

1. Speicheldiastase-Kaolin.

Es wurde gemischt:

A. 20% Speichel neutral . . . . . 10 ccm + Kaolin 8 g
B. 20% „ schwach essigsauer 10 „ + „ 8 g
C. 20% „ „ sodaalkal. 10 „ + „ 8 g

Die Filtrate wurden neutralisiert, ebenso die entsprechenden, nicht mit Kaolin vorbehandelten Kontrollen.

Versuch	Auf Jodzusatz entfärbt nach
1. Filtrat von A. 2 ccm + 1% Stärkelösung 2 ccm	∞′
2. entspr. Kontrolle 2 „ + 1% „ 2 „	3′
3. Filtrat von B. 2 „ + 1% „ 2 „	∞′
4. entspr. Kontrolle 2 „ + 1% „ 2 „	4′
5. Filtrat von C. 2 „ + 1% „ 2 „	∞′
6. entspr. Kontrolle 2 „ + 1% „ 2 „	4′

[1]) Daß Thonerde Essigsäure zum Teil neutralisiert, ist leicht erklärlich. Daß sie auch NaOH zum Teil neutralisiert, liegt daran, daß Thonerde mit so starken Basen wie NaOH Aluminate bildet.

Resultat: Speicheldiastase wird von Kaolin bei jeder Reaktion leicht adsorbiert.

2. Speicheldiastase-Talcum.

A. 20% Speichel neutral . . . . . 10 ccm + Talcum 10 g
B. 20% „ schwach essigsauer 10 ccm + „ 10 g
C. 20% „ „ sodaalkal. 10 ccm + „ 10 g
Filtrate nebst entsprechenden Kontrollen neutralisiert.

Versuch	Auf Jodzusatz entfärbt nach
1. Filtrat von A 2 ccm + 1% Stärkelösung 2 ccm	∞′
2. entspr. Kontrolle 2 „ + 1% „ 2 „	3′
3. Filtrat von B 2 „ + 1% „ 2 „	∞′
4. entspr. Kontrolle 2 „ + 1% „ 2 „	4′
5. Filtrat von C 2 „ + 1% „ 2 „	∞′
6. entspr. Kontrolle 2 „ + 1% „ 2 „	4′

Resultat: Speicheldiastase wird von Talcum vollkommen adsorbiert bei jeder Reaktion.

3. Speicheldiastase-Kohle.

A. 10% Speichel neutral 30 ccm + Blutkohle 4 g
B. 10% „ schwach soda-alkal. 30 „ + „ 4 „
C. 10% „ „ essigsauer 30 „ + „ 4 „
Die Filtrate sind klar und reagieren sämtlich neutral. Die entsprechenden Kontrollen werden ebenfalls genau neutralisiert.

Versuch bei 37° C	Auf Jodzusatz farblos nach
1. Filtrat von A. 2 ccm + 1% Stärke 2 ccm	8′
2. entspr. Kontrolle 2 „ + 1% „ 2 „	1′
3. Filtrat von B. 2 „ + 1% „ 2 „	8′
4. entspr. Kontrolle 2 „ + 1% „ 2 „	1′
5. Filtrat von C. 2 „ + 1% „ 2 „	8′
6. entspr. Kontrolle 2 „ + 1% „ 2 „	1′

Es ist demnach bei allen 3 Adsorptionsversuchen die Hauptmenge des Fermentes adsorbiert worden. Immerhin ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß dieses Resultat modifiziert werden muß, wenn man große Reihen mit stufenmäßig variierter Alkalescenz bzw. Acidität ansetzt. Wir behalten uns daher vor, dieses Resultat sowie einige andere, bei denen der Ausschlag nicht so erheblich war wie bei den anderen Versuchen im weiteren Verlauf unserer Arbeit, eventuell zu modificieren. Als vorläufiges Resultat dieses Versuches wollen wir also notieren:

Speicheldiastase wird von Kohle bei jeder Reaktion ziemlich vollständig adsorbiert.

4. Speicheldiastase-Tonerde.

7fach mit Wasser verdünnter Speichel

a) bei neutraler Reaktion:	3 ccm 1% Stärke + 1 ccm Ferment nach 3′ farblos.
α) ohne Vorbehandlung,	
β) nach Adsorption mit Tonerde (6 ccm Fermentlösung + 2 ccm Orig.-Tonerde).	Ferment völlig verschwunden.
b) 10 ccm Fermentl. + 8 Tropfen $^n/_5$-Essigsäure:	
α) nach Neutralisation mit $^n/_{10}$-NaOH,	3 ccm 1% Stärke + 1 ccm Ferment nach 4′ farblos.
β) nach Adsorption mit Tonerde wie oben (Filtrat an sich fast neutral, wird genau neutralisiert).	Ferment bis auf einen schwer meßbaren Rest verschwunden.
c) 10 ccm Fermentl. + 10 Tropfen $^n/_{10}$-NaOH,	
α) nach Neutralisation mit $^n/_5$-Essigsäure,	3 ccm 1% Stärke + 1 ccm Ferment nach 4′ farblos.
β) nach Adsorption mit Tonerde wie oben (Filtrat an sich fast neutral, wird mit $^n/_5$-Essigsäure genau neutralisiert).	Ferment völlig verschwunden.

Resultat: Speicheldiastase wird bei jeder Reaktion von Tonerde leicht adsorbiert.

C. Trypsin.

Verwendet wurde zu allen Versuchen eine 1%ige, klar filtrierte Lösung von Pankreatin Rhenania. Die Prüfung des Fermentgehaltes geschah, indem zu einer sehr dünnen (ca. 2‰igen) Caseinlösung die Versuchsflüssigkeit zugefügt wurde, und an kleinen, von Zeit zu Zeit entnommenen Proben durch einen in Vorversuchen genau ausprobierten Essigsäurezusatz das Verschwinden des Caseins aus der Lösung durch Ausbleiben der Trübung konstatiert wurde[1]). Die Versuchsflüssigkeiten wurden dabei im Wasserbad bei 37° C gehalten.

1. Trypsin-Kaolin.

A.	Trypsin neutral	20 ccm +	Kaolin	8 g
B.	„ soda-alkal.	20 „ +	„	8 „
C.	„ essigsauer	20 „ +	„	8 „

Die sämtlichen klaren Filtrate sowie die korrespondierenden Kontrollen werden schwach alkalisch gemacht.

[1]) Aus mündlicher Besprechung mit Herrn Fuld entnehme ich, daß dieser diese sehr einfache und sichere Methode in ganz ähnlicher Form auch schon angewendet hat.

Versuch	Trübung auf Essigsäurezusatz nach: 5′	9′	18′
1. Filtrat von A 0,2 ccm + Caseinlösung 5 ccm	++	++	++
2. „ „ B 0,2 „ + „ 5 „	++	++	00
3. „ „ C 0,3 „ + „ 5 „	++	++	++

Die 3 entsprechenden Kontrollen zeigten bereits nach 5 Minuten auf Zusatz verdünnter Essigsäure keine Spur Trübung mehr.

Resultat: Trypsin wird von Kaolin bei neutraler und saurer Reaktion vollkommen, bei alkalischer Reaktion nicht ganz vollkommen adsorbiert.

2. Trypsin-Talcum.
3. Trypsin-Kohle.
4. Trypsin-Tonerde.

Die Versuchsanordnung bei diesen 3 Adsorbentien war vollkommen dieselbe wie bei dem Versuche Trypsin-Kaolin. Die angewandten Mengen Adsorbens auf je 20 ccm Trypsinlösung waren:

Talcum	10 g
Knochenkohle	6 „
Tonerde	20 com.

Wir können uns also die genaue Versuchsbeschreibung ersparen und uns mit der Angabe der Resultate begnügen.

	Casein-Trübung bei Essigsäurezusatz nach: 5′	30′	60′
Talcumfiltrat neutral	++	++	++
„ alkalisch	++	fast 0	0
„ sauer	++	++	++
Kohlefiltrat neutral	++	++	++
„ alkalisch	++	++	++
„ sauer	++	++	++
Tonerdefiltrat neutral	++	++	+[+]
„ alkalisch	++	fast 0	0
„ sauer	++	++	+[+][1])

Sämtliche Kontrollen ergaben nach 5 Minuten keine Trübung mehr. Als Resultat ergibt sich also vorläufig:

Trypsin wird von Kohle bei jeder Reaktion vollkommen adsorbiert. Von Talcum und Tonerde wird es

[1]) ++ bedeutet starke Trübung, +[+] bedeutet weniger starke Trübung, 0 bedeutet keine Trübung.

bei neutraler und saurer Reaktion vollkommen, bei alkalischer Reaktion fast vollkommen adsorbiert.

Auch hier ist es nicht ausgeschlossen, daß bei Ansetzung großer Reihen mit abgestufter Alkalinität sich zeigen kann, daß Talcum und Tonerde bei alkalischer Reaktion gar kein Trypsin absorbiert. Das Resultat ist also auch nur ein vorläufiges.

D. Pepsin.

1. Pepsin-Kaolin.

Je 20 ccm einer $^1/_2$%igen Lösung von Pepsin werden bei neutraler bzw. schwach essigsaurer, bzw. schwach sodaalkalischer Reaktion mit je 8 g Koalin geschüttelt. Nur das Filtrat der alkalischen Lösung ist trüb und reagiert alkalisch, die beiden anderen Filtrate sind klar und sauer. Von diesen Filtraten sowie von drei entsprechenden, jedoch nicht mit Koalin vorbehandelten Proben wird je 1 ccm in ein Reagensglas gegeben und zu jedem der 6 Röhrchen 2 ccm einer Ricin-HCl-Lösung nach der Vorschrift von M. Jacoby[1]) zugesetzt. Nach 15 Minuten sind sämtliche Flüssigkeiten klar bis auf diejenige, welches dem Versuch Pepsin alkalisch — Kaolin entspricht, nebst dem entsprechenden Kontrollröhrchen. Diese beiden bleiben dauernd trüb. Daraus folgt, daß bei neutraler und saurer Reaktion Pepsin von Kaolin nicht adsorbiert wird, sowie daß schon ganz schwach alkalische Reaktion genügt, um das Pepsin dauernd zu zerstören, so daß man nicht konstatieren kann, ob bei alkalischer Reaktion eine Adsorption statt hat oder nicht.

2. Pepsin-Talcum.

Versuch.

A. Pepsin $^1/_2$% schwachsauer + Talcum 10 g
B. „ neutral + „ 10 g
C. „ schwach alkal. + „ 10 g

Das Filtrat von A reagiert sauer
„ „ „ B „ neutr. (Spur alk.)
„ „ „ C „ alk.

Alle Filtrate sind klar.

Je 1 ccm der Filtrate, sowie der entsprechenden nicht mit Talcum behandelten Kontrollen wurde neutralisiert und mit je 2 ccm einer Ricinsalzsäurelösung nach Jacoby versetzt und bei 37° im Wasserbad gehalten. Klar waren nach 15 Minuten nur zwei Kontrollröhrchen, und zwar das ursprünglich neutrale und das saure. Alle übrigen Lösungen blieben dauernd trüb. Es war also in der neutralen und sauren Lösung alles Ferment vom Talcum adsorbiert worden, in der alkalischen Lösung jedoch alles Ferment zerstört.

Demnach ergibt dieser Versuch, daß Talcum das Pepsin in neutraler und saurer Lösung vollkommen adsorbiert,

[1]) M. Jacoby, Diese Zeitschr. **1**, 53, 1906.

sowie, daß das Verhalten in alkalischer Lösung sich nicht feststellen läßt.

3. Pepsin-Kohle.

Der Versuch wird analog dem vorhergehenden angesetzt, nur statt Talcum jedesmal 8 g Knochenkohle genommen. Die Filtrate nebst den korrespondierenden Kontrollen werden bei salzsaurer ($^n/_{10}$-)Reaktion mit Mettschen Pferdeserumröhrchen beschickt. Dabei ergibt sich, daß in den Kontrollröhrchen die Verdauung gleichmäßig fortschreitet, in den mit Kohle vorbehandelten Fermentlösungen auch nach tagelanger Einwirkung keine Verdauung eintritt.

Es wird also Pepsin von Kohle bei neutraler und saurer Reaktion vollkommen adsorbiert.

4. Pepsin-Tonerde.

1% Pepsinlösung wird bei neutraler, resp. spuressigsaurer Reaktion mit gleichen Teilen Tonerdeemulsion (siehe oben) gemischt, entsprechende Kontrolle mit gleichen Teilen Wasser.

Das Filtrat Pepsin neutral + Tonerde zeigt dann gegenüber der entsprechenden Kontrolle Spuren von proteolytischer Kraft, während das Filtrat essigsauer Tonerde eine Ricin-HCl-Lösung selbst nach Stunden nicht aufhellt, die entsprechende Kontrolle dagegen schon nach 5 Minuten.

Demnach adsorbiert Tonerde Pepsin vollkommen in saurer Lösung, zum größten Teil in neutraler. Da der Absorptionsgrad abnimmt gegen den Neutralpunkt zu, ist es nicht unwahrscheinlich, daß bei alkalischer Reaktion eine Adsorption nicht stattfindet, jedoch läßt sich dies nicht feststellen.

E. Pepsinlab.

1. Pepsinlab-Kaolin. 2. Pepsinlab-Talcum.

Die bei den Versuchen Pepsin-Kaolin und Pepsin-Talcum gewonnenen Filtrate wurden nebst ihren Kontrollen auch auf ihren Labgehalt untersucht. Zu diesem Zwecke wurde Filtrat und Kontrolle neutralisiert, je 1 ccm zu je 5 ccm verdünnter, mit $CaCl_2$ versetzter Milch zugesetzt und der Eintritt der Labung notiert. Dabei zeigte sich, daß Talcum alles Lab bei neutraler sowie saurer Lösung adsorbiert hatte, daß dagegen Kaolin weder in neutraler noch in saurer Lösung Lab adsorbiert hatte.

Es zeigt sich demnach vollständige Übereinstimmung der proteolytischen und labenden Wirkung, was in Anbetracht der Anschauung von Pawlow beachtenswert ist.

F. Lab.

Das „Labferment" (Grübler) zeigte sich für Adsorptionsversuche als sehr wenig geeignet, da es einerseits durch Spuren Alkali zerstört wird, anderseits

auch größere Mengen Säure nicht verträgt. Die Versuche erstrecken sich daher nur auf das Verhalten von Lab gegenüber Kaolin und Talcum. Die Prüfung des Labgehaltes wurde vorgenommen, indem die Fermentlösung zu einigen Kubikzentimeter einer 20 fach verdünnten Milch, die 5 ccm Calcium-Chlorid auf 200 Flüssigkeit enthielt (im Versuch Milch genannt), zugesetzt, und der Zeitpunkt der Gerinnung notiert wurde.

Hier ein Versuch mit Kaolin und Talcum, der sich nur auf saure und alkalische, nicht aber neutrale Reaction bezieht.

Je 20 ccm einer 0,25 $^0/_{00}$ Lablösung werden bei schwach essigsaurer, bzw. schwach soda-alkalischer Lösung mit Kaolin, bzw. Talcum geschüttelt:

A.	Lablösung	alk.	20 +	Kaolin	8 g
B.	„	sauer	20 +	„	8 g
C.	„	alk.	20 +	Talcum	10 g
D.	„	sauer	20 +	„	10 g

Die Filtrate werden genau neutralisiert, ebenso drei entsprechende, nicht mit Adsorbens vorbehandelte Kontrollen.

	Versuch					Labung erfolgt nach:
1.	Filtrat von A	1 ccm	+	„Milch“	3 ccm	∞,
2.	„ „ B	1 „	+	„	3 „	∞'
3.	„ „ C	1 „	+	„	3 „	∞'
4.	„ „ D	1 „	+	„	3 „	∞'
5.	Lablösung alkal. Kontrolle . .	1 „	+	„	3 „	∞'
6.	„ „ „ gekocht	1 „	+	„	3 „	∞'
7.	„ sauer „ . . .	1 „	+	„	3 „	6′
8.	„ „ „ gekocht[1])	1 „	+	„	3 „	∞'

Es war also Labung nur bei der sauren Kontrolle eingetreten. Die alkalische Lablösung war unwirksam geworden. Der Versuch zeigt also nur, daß Kaolin und Talcum Lab bei saurer Reaktion vollständig adsorbieren, bei alkalischer Reaktion läßt sich das Verhalten nicht feststellen. Der Versuch verläuft in derselben Weise, wenn man statt der sehr dünnen eine sehr konzentrierte Lablösung verwendet. Genauere Prüfung des Labfermentes wäre noch erwünscht.

G. Invertin.

Verwendet wurde zu den Versuchen mit Invertin ein Hefeschüttelextrakt, das mit Kaolin enteiweißt war. Die genaue Vorschrift ist nachzulesen bei Michaelis. Das Schüttelextrakt wurde unverdünnt verwendet, seine Wirksamkeit im Polarimeter bestimmt.

1. Invertin-Kaolin.

Michaelis hatte bereits festgestellt, daß bei saurer und neutraler Reaktion keine Spur Invertin vom Kaolin adsorbiert wird. Unser jetziger

[1]) Um zu beweisen, daß die Caseinfällung in 7 durch das Ferment erfolgt war.

Versuch soll nun auch feststellen, wie sich das Ferment bei beliebiger d. h. auch alkalischer Reaktion verhält.

A) Invertin neutral . . . . 15 ccm + Kaolin 7 g
B) „ stark soda-alkalisch 15 „ + „ 7 „
C) „ stark essigsauer . 15 „ + „ 7 „

Zu dem folgenden Versuch wurden alle Filtrate und die 3 entsprechenden Kontroll-Fermentlösungen sehr schwach sauer gemacht.

	Versuch		Drehung n. 24 St.
1. Wasser	2 ccm + 5%	Saccharoselösung 18 ccm	+ 3,42
2. Filtrat von A	2 „ + 5%	„ 18 „	+ 0,18
3. „ „ B	2 „ + 5%	„ 18 „	+ 1,62
4. „ „ C	2 „ + 5%	„ 18 „	+ 0,31
5. Invertin neutral (Kontrolle)	2 „ + 5%	„ 18 „	+ 0,30
6. „ alkalisch „	2 „ + 5%	„ 18 „	+ 1,66
7. „ sauer „	2 „ + 5%	„ 18 „	+ 1,75

Der Versuch zeigt also, daß Invertin von Kaolin bei keiner Reaktion adsorbiert wird.

2. Invertin-Kohle.

Dieser Versuch ist vollständig analog dem vorher beschriebenen angesetzt worden unter Benutzung derselben Fermentlösung und Kontrollen, nur ist anstatt Kaolin 7 g jedesmal zu setzen: Knochenkohle 5 g.

Die entsprechenden Resultate lauten dann:

	Versuch		Drehung n. 24 St.
1. Wasser	+	Saccharoselösung	3,42
2. Kohle-Invertin neutral	+	„	3,42
3. „ alkalisch	+	„	3,44
4. „ sauer	+	„	3,46
5. Kontrolle neutral . .	+	„	0,30
6. „ alkalisch . .	+	„	1,66
7. „ sauer . . .	+	„	1,55

Das Zurückbleiben der Inversion bei den Kontrollen 6 und 7 ist dadurch zu erklären, daß durch den reichlichen Säure- und Alkalizusatz das Ferment ein wenig geschädigt wurde.

Resultat. Invertin wird von Kohle vollständig adsorbiert bei jeder Reaktion.

3. Invertin-Talcum.

Auch dieser Versuch wurde wie die vorhergehenden angesetzt. Zu je 20 ccm Hefeextrakt (neutral, alkalisch und sauer) wurden je 10 g Talcum zugesetzt, filtriert und schließlich Filtrate und Kontrollen zum Versuch schwach sauer gemacht.

Versuch					Drehung n. 24 St.
1. Wasser	3 ccm	+ 5%	Saccharoselösung	12	+ 3,16
2. Talcum-Invertinfiltrat (neutral)	3 „	+ 5%	„	12	+ 2,75
3. „ (alkalisch)	3 „	+ 5%	„	12	+ 0,10
4. „ (sauer)	3 „	+ 5%	„	12	+ 3,17
5. Invertin neutral (Kontrolle) .	3 „	+ 5%	„	12	− 0,39
6. „ alkalisch „ .	3 „	+ 5%	„	12	− 0,36
7. „ sauer „ .	3 „	+ 5%	„	12	− 0,40

Es ergibt sich daraus das Resultat, daß Invertin von Talcum bei saurer Reaktion komplett, bei alkalischer Reaktion fast gar nicht adsorbiert wird.

4. Invertin-Tonerde.

Es wurden immer je 10 ccm der Fermentlösung (bei verschiedener Reaktion) mit je 10 ccm der Tonerdeemulsion gemischt und filtriert, die entsprechende Kontrolle mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und zuletzt Filtrate und Kontrollen zu dem Versuch schwach sauer gemacht (Essigsäure).

Versuch					Drehung n. 1 St.
1. Wasser	4 ccm	+ 7%	Rohrzuck.-Lsg.	12	+ 3,82
2. Tonerde-Invertin-Filtr. neutr.	4 „	+ 7%	„ „	12	+ 2,82
3. „ „ „ alk.	4 „	+ 7%	„ „	12	+ 2,75
4. „ „ „ sauer	4 „	+ 7%	„ „	12	+ 3,08
5. Invertin-Wasser neutr. (Kontr.)	4 „	+ 7%	„ „	12	+ 1,50
6. „ „ alk. „	4 „	+ 7%	„ „	12	+ 1,00
7. „ „ sauer „	4 „	+ 7%	„ „	12	+ 0,87

NB. Die Tonerde ist in diesem Falle an sich nicht sehr adsorptionstüchtig, weil sie ausnahmsweise aus Alaun bereitet wurde. Die Resultate sind trotzdem eindeutig.

Resultat.

Tonerde adsorbierte bei jeder Reaktion einen großen Teil des Invertins.

Einige fernere Versuche mit kolloidalem Eisenhydroxyd sind nur in der folgenden Übersichtstabelle registriert.

Übersichtstabelle.

		Pflanzliche Diastase	Tierische Diastase	Trypsin	Pepsin	Lab	Pepsinlab	Invertin
Kaolin	neutral	00	++	++	00	++	00	00
„	alk.	00	++	+	—	—	—	00
„	sauer	++	++	++	00	++	00	00
Talcum	neutral	00	++	++	++	++	++	++
„	alk.	00	++	+	—	—	—	00
„	sauer	00	++	++	++	++	++	++
Kohle	neutral	++	++	++	++			++
„	alk.	00	++	++	—			++
„	sauer	++	++	++	++			++
Thonerde	neutral	++	++	++	++			+
„	alk.	++		+	—			+
„	sauer	+		++	++			+
Eisenhydroxyd	neutral	++			++			++
„	alk.				—			
„	sauer				++			

++ bedeutet vollkommen adsorbiert.
\+ „ zum größten Teil adsorbiert.
00 „ gar nicht adsorbiert.
— „ nicht untersuchbar.

Theoretisch ist es natürlich gleichgültig, ob ein Ferment nur fast vollständig oder vollständig adsorbiert wird; darüber entscheiden zufällig gegebene Mengenverhältnisse von Adsorbens und Ferment; von prinzipiellem Gegensatz ist nur der völlige Mangel der Adsorbierbarkeit.

Nachdem wir nun unsere tatsächlichen Befunde aufgezählt haben, wenden wir uns wieder der theoretischen Deutung derselben zu. Wir hatten schon in der Einleitung darauf hingewiesen, daß a priori zwei Arten von Adsorptionserscheinungen möglich sind. Wir wollen sie unterscheiden als die mechanische und die elektrochemische Adsorption.[2]) Die mechanische Adsorption, auf welche Freundlich fast allein Rücksicht

[1]) Vor Vermischung mit der Zuckerlösung neutralisiert (bis in spurweise saurer Reaktion).

[2]) Ausführlicheres darüber in dem demnächst erscheinenden Artikel „Kolloide" von L. Michaelis in dem Handbuch „Physikalische Chemie und Medizin" von Korányi und Richter.

genommen hat, kann dann zustande kommen, wenn die Oberfläche der Flüssigkeit gegen das Adsorbens eine hohe Oberflächenspannung besitzt und durch eine Adsorption des gelösten Stoffes eine Verminderung dieser Oberflächenspannung erzielt werden kann. Es können elektrisch neutrale Moleküle wie Ionen den Gesetzen der mechanischen Adsorption folgen. Die elektrochemische Adsorption kann dann zustande kommen, wenn das Adsorbens gegen die Flüssigkeit eine hohe elektrische Potentialdifferenz zeigt und durch die Adsorption des gelösten Stoffes eine Verminderung derselben erreicht werden kann. Um auf die elektrochemische Natur eines Stoffes aus dem Sinn seiner Adsorbierbarkeit einen Schluß zu ziehen, müssen wir solche Adsorbentien wählen, bei denen eine mechanische Adsorption nicht in Frage kommt und alle Adsorptionserscheinungen auf elektrochemischem Wege zustande kommen. Ferner aber müssen wir solche Adsorbentien wählen, welche möglichst unter allen Bedingungen entschiedene und einsinnige Ladungen tragen. Wir müssen also unter den von uns angewendeten Adsorbentien diejenigen heraussuchen, bei denen diese Bedingungen erfüllt sind. Als geeignete Testobjekte dafür sind die organischen Farbstoffe zu verwerten; als basische Farbstoffe Fuchsin, Methylviolett, Methylenblau, als saure Farbstoffe Pikrinsäure und besonders Eosin. Amphotere Farbstoffe, welche saure und basische Gruppen enthalten, wie Alkaliblau, Chromgrün, Chromviolett sind für uns zunächst nicht brauchbar. Wenn wir nun unsere Adsorbentien gegen diese Farbstoffe prüfen, so ergibt sich folgendes vorläufige Resultat, dessen genauere Durcharbeitung wir uns für später vorbehalten möchten. Kohle und Talcum geben zweideutige Resultate, indem sie sowohl saure wie basische Farbstoffe adsorbieren; ihre Affinität zu den basischen Farbstoffen scheint allerdings zu überwiegen. Jedoch sind die Resultate theoretisch noch unklar; entweder kommt hier das Moment der mechanischen Adsorption wesentlich mit in Frage, oder die Absorbentien ändern je nach der Reaktion des Mediums den Sinn ihrer Ladung. Scharfe und eindeutige Resultate dagegen gibt Kaolin, Tonerde und Eisenhydroxyd. Kaolin adsorbiert in neutraler, alkalischer und saurer Lösung immer nur basische Farbstoffe, dagegen nicht einmal spurweise saure Farbstoffe; es entfärbt nicht einmal an-

deutungsweise die allerverdünntesten Eosinlösungen. Dagegen adsorbiert Tonerde (und Eisenhydroxyd) bei allen Reaktionen nur saure Farbstoffe, nicht im geringsten aber basische Farbstoffe. Es wird nächstens Gelegenheit genommen werden, die theoretische Erklärung dafür zu geben. Für jetzt genügt es festzustellen, daß alle Substanzen, die durch Kaolin adsorbiert werden können, Basen sein müssen, alle Substanzen, die durch Tonerde adsorbiert werden können, Säuren sein müssen.

Auf Grund dieses Leitsatzes sind wir aber in die Lage gesetzt, mit Leichtigkeit die elektrochemische Natur der von uns geprüften Fermente festzustellen:

Invertin wird bei allen Reaktionen von Tonerde adsorbiert, bei keiner Reaktion von Kaolin, hat also den Charakter einer Säure.

Pepsin wird von Tonerde, nicht aber von Kaolin absorbiert, hat also ebenfalls den Charakter einer Säure.

Malzdiastase wird bei neutraler und alkalischer Reaktion von Kaolin nicht adsorbiert, verhält sich also unter diesen Bedingungen wie eine Säure; es wird aber bei saurer Reaktion von Kaolin adsorbiert, wird demnach durch saure Reaktion positiviert; es ist also, wie die Eiweißkörper, ein amphoterer Körper, und zwar mit stärkeren sauren als basischen Eigenschaften. Ganz dementsprechend wird Diastase von Tonerde bei neutraler und alkalischer Reaktion sehr vollkommen, bei saurer Reaktion unvollkommen adsorbiert.

Speicheldiastase wird unter allen Umständen von Kaolin und Tonerde adsorbiert, ist also ein amphoterer Körper.

Trypsin wird von Kaolin und Tonerde adsorbiert, ist also ein amphoterer Körper.

Diese Methode der „Adsorptionsanalyse" ist ein Gegenstück zu der seinerzeit von P. Ehrlich inaugurierten Farbanalyse. Handelt es sich dort darum, aus den absorbierenden Eigenschaften eines festen Körpers (gegenüber Farbstoffen) einen Schluß auf seine Natur zu ziehen, so handelt es sich hier darum, die Eigenschaften der Absorbierbarkeit von gelösten Körpern zur Erforschung ihrer Natur zu benutzen.

Berichtigung.

In der Arbeit von E. Buchner und F. Klatte, diese Zeitschr. 8, muß es heißen

S. 539, Tabelle VI in der Spalte mit der Überschrift „Zusatz nach 4 Tagen von":

20 ccm Kochsaft . . . . . statt 20 ccm Preßsaft.

Das Gleiche gilt für die Fortsetzung der Tabelle VI auf S. 540.

In der Arbeit von C. Neuberg, diese Zeitschr. 9, muß es heißen

S. 552, Zeile 16 von oben:

200,0 g . . . . . statt 100,0 g.

S. 553, Zeile 14 von unten:

200,0 g . . . . . „ 100,0 g.

In der Arbeit von L. Marchlewski, diese Zeitschr. 10, muß es heißen

S. 157, Zeile 5 von unten:

0,025 g . . . . . statt 0,0025 gr.

S. 165, Zeile 1 von oben:

He_V-Linie . . . . . „ He_{VI}-Linie.

S. 165, Zeile 16 von unten:

Chlorophyllan . . . . . „ Chlorophyll.

Über die bei der Wassermannschen Luesreaktion wirksamen Körper und über die hämolytischen Eigenschaften der Organextrakte.

Von

Dr. J. Bauer, Assistenzarzt.

(Aus dem Laboratorium der Klinik für Kinderheilkunde in Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. Schloßmann.)

(Eingegangen am 2. Mai 1908.)

Die Ansicht, daß es sich bei der Wassermannschen Syphilisreaktion um eine spezifische Komplementablenkungsreaktion handelt, ist fast allgemein verlassen worden, nachdem von Porges[1]) und gleichzeitig von Landsteiner, Müller und Plötzl[2]) die Alkohollöslichkeit der in den Organextrakten wirksamen Substanzen gefunden worden war. Wir haben es nicht mit Eiweißlösungen, folglich auch nicht mit Antigenen zu tun, zwei Begriffe, die trotz einiger Versuche bis heute noch nicht zu trennen sind. Porges konnte den Organextrakt durch Lecithin ersetzen, Levaditi und Yamanouchi[3]) durch glykotaurocholsaures Natrium, Sachs und Altmann[4]) durch oleinsaures Natrium. Ich konnte mich überzeugen, daß sapo medicatus sich ebenso wie das oleinsaure Natrium verhält.

[1]) Porges, Verhdl. d. Berl. Med. Ges., Berl. klin. Wochenschr. 1907, 1655.

[2]) Landsteiner, Müller und Plötzl, Zur Frage der Komplementbindungsreaktionen bei Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 50.

[3]) Levaditi und Yamanouchi, Le sérodiagnostic de la syphilis. Compt. rend. 63.

[4]) Sachs und Altmann, Über die Wirkung des oleinsauren Natrons bei der Wassermannschen Reaktion auf Syphilis. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10.

Doch wird einstimmig angegeben, daß die besten Resultate mittels der Organextrakte erzielt werden.

Daß es sich auch bei dem sogenannten „Antikörper" im Luesserum nicht um einen Immunkörper handelt, geht aus meinen Untersuchungen[1]) hervor, nach denen sich bei geeigneter Versuchsanordnung die „Antikörperwirkung" auch mit normalem Menschenserum, wenn auch in geringerem Maße als mit luetischem, erreichen läßt. In Wahrheit handelt es sich hier um antikomplementäre Substanzen, die im Verein mit dem wirksamen Bestandteil des Organextrakts die Hämolyse hemmen.

Ausfällbarkeit der „Hemmungskörper" im luetischen Serum durch Dialyse.

Neuerdings konnte ich durch 18—24 stündiges Dialysieren des Luesserums gegen fließendes Wasser diese „Hemmungsstoffe" ausfällen.

Versuch.

5 ccm Luesserum Br. und 5 ccm Normalserum E. werden 24 Stunden mittels Hausenblasen gegen fließendes Wasser dialysiert. Man erhielt am nächsten Tage 10,5 ccm Luesserum und 10 ccm Normalserum. Nach scharfem Zentrifugieren gewann man Niederschlagssäulchen von 0,8 mm des Luesserums und 0,2 mm des Normalserums. Diese Sedimente wurden zweimal gewaschen und dann auf die ursprüngliche Flüssigkeitsmenge mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt.

Die Abgüsse hemmten nun die Hämolyse eines zugesetzten hämolytischen Systems, auch mit Organextrakt zusammen, durchaus nicht; es ließ sich sogar nachweisen, daß der gegen Hammelblut gerichtete Amboceptor, der in jedem Menschenserum vorhanden ist, sich zum größten Teil im Abguß findet.

Das Sediment verhielt sich wie folgendes Beispiel zeigt:

Es werden vier Reihen angesetzt. In der ersten und zweiten befinden sich absteigende Mengen des Luessediments; jedes Röhrchen wird mit phys. Kochsalzlösung auf 2 ccm aufgefüllt. In der ersten Reihe enthält außer dem Luessediment jedes Röhrchen noch 1 ccm eines Organextraktes, wie er zum Anstellen der Wassermannschen Reaktion benutzt wird.[2])

---

[1]) Bauer, Zum Wesen der Wassermannschen Reaktion. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 17.

[2]) Methodik siehe: Bauer, Zur Methodik des serologischen Luesnachweises. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 16. Der alkohol. Organextrakt wurde stets in der dort beschriebenen Weise hergestellt.

Die dritte und vierte Reihe enthielten die Sedimente des Normalserums resp. diese im Verein mit Leberextrakt in derselben Weise wie Reihe 1 und 2. In jedes Röhrchen kommt nun 0,1 Meerschweinchenserum, darauf bleiben die Reihen eine halbe Stunde bei 37° und dann wird 1,0 ccm 5%iges sensibilirtes Hammelblut hinzugefügt.

Tabelle 1.

Mengen der Sedimentaufschwemmungen ccm	Hämolyse von 1 ccm 5%igem, sensibilsiertem Hammelblut durch 0,1 Meerschweinchenserum, zuvor digeriert mit			
	Organextrakt + Luessediment	Luessediment	Organextrakt + Normalsediment	Normalsediment
0,5	0	komplett	stark	komplett
0,25	0	„	komplett	„
0,1	mäßig	„	„	„
0,05	komplett	„	„	„

Verglich man diese Werte mit der Ablenkungsfähigkeit des nativen Luesserums, so zeigte sich, daß ein kleiner Teil der Ablenkungskraft wohl durch die Prozeduren des Zentrifugierens und Waschens verloren gegangen war. Das oben benutzte Lueserum Br. gab noch bei Anwendung von 0,05 ccm eine positive Wassermannsche Reaktion. Im wesentlichen war aber bewiesen, daß die luetischen Hemmungskörper mit dem Globulinniederschlag ausgefällt waren.

Dieser Befund gewinnt an Interesse im Hinblick auf die Arbeiten Klausners[1]). Klausner gab eine neue diagnostische Luesreaktion an, die darin besteht, daß bei Mischung von Luesserum und destilliertem Wasser in bestimmtem Verhältnis eine Fällung auftritt, die das Serum eines Gesunden angeblich nicht zeigt. Sie beruht darauf, daß luetische Sera eine bessere Globulinfällbarkeit zeigen oder globulinreicher sind. Tatsächlich fand ich auch, daß die Luessera häufig einen stärkeren Niederschlag bei der Dialyse gaben als die normalen, aber immerhin wurden sie von manchen Normalseren in der Globulinmenge erreicht. Die Klausnersche Methode hat sich auch bei weiteren Nachuntersuchungen[2]) nicht bewährt, fand doch Klausner

[1]) Klausner, Wiener med. Wochenschr. 1908, 7 u. 11.

[2]) Nobl und Arzt, Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 9. — Fritz und Kren, Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 12.

selbst nach seiner zweiten Mitteilung einen positiven Ausfall seiner Reaktion bei Patienten, die an Tuberkulose, Typhus usw. erkrankt waren.

Daß die Luessera im allgemeinen einen starken Globulinniederschlag geben, liegt also möglicherweise daran, daß die luetischen „Hemmungstsoffe" mit niedergerissen werden. Wenn ich die Niederschläge mit Alkohol extrahierte, konnte ich die Hemmungskörper im Sediment nicht wiederfinden.

Beziehungen der bei der Luesreaktion wirksamen Bestandteile des Organextraktes zu den hämolytischen.

Die Alkohollöslichkeit scheint das allen Substanzen, die bei der Lucsablenkung in Betracht kommen, Gemeinsame zu sein. Aus diesem Grunde haben auch Sachs und Altmann, nachdem sich Lecithin und gallensaure Satze als zur Ablenkung geeignet erwiesen haben, die Wirkung des oleinsauren Natriums geprüft. Sie fanden dabei die merkwürdige Tatsache, daß das oleinsaure Natrium in derselben Menge, in der es mit Luesserum zusammen antikomplementär wirkt, selbst hämolytisch wirkt. Es handelt sich dabei um die Seifenhämolyse, die nach Untersuchungen von Noguchi[1]) und v. Liebermann[2]) durch Serumzusatz aufgehoben wird.

Es war daher von Interesse, zu untersuchen, wie sich der Extrakt aus der Leber eines syphilitischen Säuglings, den ich gewöhnlich zur Anstellung der Wassermannschen Reaktion benutzte, in dieser Hinsicht verhielt. Der alkoholische Extrakt ist eine klare, leicht grünlich gefärbte Flüssigkeit. Setzt man zu derselben physiologische Kochsalzlösung, so entsteht eine emulsionsartige Flüssigkeit. Diese hat starke hämolytische Wirksamkeit, deren sie verlustig geht, sobald man eine relativ geringe Menge irgend welchen Serums zusetzt. Sie erhält dann sogar komplementhemmende Eigenschaften.

Anfänglich wurde die Wassermannsche Reaktion mit wässerigen Leberextrakten angestellt. Es zeigte sich nun, daß

---

[1]) Noguchi, On certain chemical complementary substances. Proc. Soc. Exper. Biolog. 4, 1907.

[2]) v. Liebermann, Über Hämagglutination und Hämatolyse. Diese Zeitschr. 4, 25, 1907.

Tabelle 2.

Mengen des Menschenserums	Hämolyse von 1 ccm 5%igen Hammelbluts durch 0,05 alkoholischen Leberextrakt und (jedes Röhrchen auf 3 ccm aufgefüllt)	
ccm	A. Luesserum	B. Normalserum
0,01	0	0
0,005	0	0
0,0025	Spur	Spur
0,0015	mäßig	mäßig
0,001	komplett	komplett
0	„	„

auch diese hämolytisch wirkten und auch hier wurde die Hämolyse durch Serumzusatz aufgehoben. Auch die wässerigen Extrakte ergaben mit Luesserum vereinigt in derselben Dosis, in der sie an sich hämolytisch wirkten, eine typische Wassermannsche Hemmung der Hämolyse. Die wässerigen und ebenso die alkoholischen Leberextrakte waren coctostabil.

Anfänglich schien es fast, als ob der alkoholische Organextrakt nicht hitzebeständig sei. Es wurde die 1 ccm einer 5%igen Hammelblutaufschwemmung gerade noch lösende Menge des Extraktes bestimmt. Es zeigte sich, daß 1 ccm einer $^1/_{20}$ Verdünnung bei 37° in 3 bis 4 Stunden vollständig löste. Darauf wurde der Extrakt eine halbe Stunde erhitzt, und es ergab sich bei Blutzusatz, nun folgendes:

Erhitzung des Extraktes bei	56°:	70°:	100°:
	vollständig gelöst	keine Lösung	keine Lösung.

Der Organextrakt schien also thermolabil zu sein. Bei näherer Prüfung zeigte sich aber, daß diese Hitzeunbeständigkeit nur für diese geringste lösliche Dosis galt; nahm man hingegen etwas mehr des selbst auf 100° erwärmten Extrakts, so zeigte sich die unversehrte hämolytische Fähigkeit.

Dieses Verhalten der Organextrakte erklärt vielleicht die Differenz der Befunde Morgenroth und Korschuns[1]) einerseits und Tarassevitschs[2]) andererseits. Letzterer versuchte

[1]) Morgenroth u. Korschun, Über die hämolytischen Eigenschaften von Organextrakten. Berl. klin. Wochenschr. 1902, Nr. 37.

[2]) Tarassevitsch, Sur les Cytases. Annales de l'Inst Pasteur 1902.

Tabelle 3.

Mengen des Extrakts	Hämolyse von 1 ccm 5%igen Hammelblut durch $^1/_{20}$ verdünnten alkoholischen Leberextrakt, der $^1/_2$ Stunde erhitzt war								
	A. unerhitzt nach			B. bei 56° nach			C. bei 80° nach		
ccm	40′	80′	120′	40′	80′	120′	40′	80′	120′
2,0	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	0	komplett	komplett
1,75	„	„	„	„	„	„	0	„	„
1,5	mäßig	„	„	Spur	„	„	0	stark	„
1,25	wenig	„	„	0	„	„	0	mäßig	„
1,0	0	0	komplett	0	0	mäßig	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

die Organauszüge wegen ihrer Thermolabilität mit den Komplementen zu identifizieren. Daß davon hier keine Rede sein kann, ergibt sich aus obiger Tabelle.

Die zur Luesreaktion benutzten Organextrakte verhielten sich also in ihren hämolytischen Eigenschaften im wesentlichen so wie die von Morgenroth und Korschun beschriebenen Organextrakte. Die Coctostabilität derselben gilt auch für ihre Brauchbarkeit zur Wassermannschen Luesreaktion. Die übliche Verdünnung des Leberextraktes ergab noch nach ihrer Erhitzung auf 100° mit Luesserum einen positiven Ausschlag der Reaktion, während sie mit Normalserum vereint, nicht ablenkte.

Es ließ sich ferner zeigen, daß die wässerigen Extrakte insofern mit den von Morgenroth und Korschun beschriebenen übereinstimmten, als sie beim Stehen einen Niederschlag bildeten. Zentrifugierte man diese Lösungen oder filtrierte sie, so zeigte die klare Lösung weder hämolytische Fähigkeiten, noch ließ sie sich zur Luesablenkung benutzen. Alle diese parallelen Erscheinungen weisen darauf hin, daß es dieselben Substanzen sind, die einmal hämolytisch wirken, andrerseits bei der Wassermannschen Reaktion eine antilytische Tätigkeit entfalten.

Die Wirkung der hämolytischen und lysehemmenden Körper der Organextrakte in Rohrzucker.

Noch in einer anderen Eigenschaft des Organextrakts suchte ich diesen Parallelismus nachzuweisen. Setzt man zu dem alkoholischen Organauszug physiologische Kochsalzlösung zu, so bildet sich, wie schon erwähnt, eine Emulsion. Diese Flüssigkeit hellt sich bei Zusatz von Serumeiweiß sofort auf. Es entstand nun die Frage, ob dieser Klärungsprozeß in Zusammenhang steht mit der Aufhebung der hämolytischen Wirksamkeit einerseits und der Bindungsfähigkeit des Extrakts mit den luetischen Hemmungsstoffen. Der Alkoholauszug wurde mit einer isotonischen (7,8%) Rohrzuckerlösung in demselben Verhältnis wie mit Kochsalzlösung verdünnt und die Hämolyse von Hammelblut geprüft.

Tabelle 3.

Mengen des Extrakts ccm	Hämolyse von 1 ccm 5%iger Hammelblutkörperchenaufschwemmung durch alkoholischen Leberextrakt (jedes Röhrchen auf 3 ccm aufgefüllt)					
	A. in Kochsalzlösung nach			B. in Rohrzuckerlösung nach		
	½ Std.	1 Std.	2 Std.	½ Std.	1 Std.	2 Std.
0,25	komplett	komplett	komplett	Spur	mäßig	komplett
0,15	„	„	„	0	Spur	stark
0,1	„	„	„	„	0	wenig
0,05	0	0	„	„	„	0
0,025	0	0	0	„	„	„
0	0	0	0	„	„	„

Die Trübung des Extrakts tritt bei Rohrzucker oder Wasserzusatz nicht auf. Es zeigte sich auch, wie Tabelle 2 ergibt, daß die hämolytische Kraft des Alkoholauszugs stark vermindert ist. Dem Salzgehalt der Lösung scheint demnach eine wichtige Rolle bei der Wirksamkeit des Organextrakts zuzufallen. Ich wollte daher auch das Auftreten des Wassermannschen Luesphänomens in Rohrzuckerlösung prüfen.

Es war von vornherein nicht zu erwarten, daß dieser Versuch gelingt, wenn man die Wassermannsche Anordnung trifft, da nach den Untersuchungen von Sachs und Teruuchi[1])

[1]) Sachs u. Teruuchi, Die Inaktivierung der Komplemente im salzfreien Medium. Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 16, 17, 19.

die Hämolyse durch einen immunisatorisch gewonnenen Amboceptor + Komplement in Rohrzuckerlösung ausbleibt. Anders lagen die Dinge, wenn ich die Luesreaktion in der von mir geübten Weise anstellte, in dem ich als blutlösenden Amboceptor den Normalamboceptor des Menschenserums verwende. Hatten doch Sachs und Teruuchi gerade gefunden, daß z. B. Meerschweinchenserum in Rohrzucker Rinderblut löst, eine Hämolyse, die in Kochsalzlösung ausbleibt und daraus, ebenso wie Girard-Mangin und Henri[1]), geschlossen, daß normale Sera in Rohrzuckerlösung stärker hämolytisch wirken als in Kochsalzlösung. Ich mußte daher prüfen, ob das hämolytische System: Hammelblut, inaktives Menschenserum, Meerschweinchenkomplement, in Rohrzuckerlösung zu gebrauchen ist.

Tabelle 4.

Mengen des Menschenserums	Hämol. v. 1 ccm 5%igen Hammelbluts durch abfallende Mengen inaktiven Menschenserums und 0.1 ccm Meerschweinchenserum (jed. Röhrchen auf 3 ccm gebracht)	
ccm	A. in Kochsalzlösung	B. in Rohrzuckerlösung
1,0	komplett	Spur
0,5	„	0
0,25	„	„
0,1	„	„
0,05	„	„
0,025	„	„
0,01	mäßig	„
0	0	„

Als Resultat ergab sich also, daß die Luesreaktion in Rohrzuckerlösung nicht ausführbar ist, weil auch bei Verwendung eines Normalamboceptors die Rohrzuckerhämolyse des Hammelblutes ausbleibt.

Vereinigung der Extraktlysine mit Blutserum.

Wie wir sahen, wird durch Zusatz einer genügenden Blutserummenge die trübe Kochsalzaufschwemmung des alkoholischen Organextrakts wieder klar. Setzt man nun absteigende Menge von Serum zu, so kann man beobachten, daß genau dort, wo

[1]) Zitiert nach Sachs und Teruuchi (s. o.).

die Serummengen so gering sind, daß sie keine Aufhellung mehr bewirken, die lytische Kraft des Extraktes wieder zur Geltung kommt.

Diese Verbindung der lipoiden Stoffe mit Serum, die auch bei der Wassermannschen Luesablenkung eine große Rolle spielt, hat neuerdings sehr an Interesse gewonnen.

v. Liebermann (l. c,) und Noguchi[1]) haben die Seifen in Beziehung zu den Serumkomplementen bringen wollen. Noguchi zeigte, daß Seifenlösungen ebenso wie Extrakte aus Blut und Organen durch Blutserum ihre hämolytische Kraft verlieren. Trotzdem identifiziert Noguchi die Seifen mit den Komplementen, indem er annimmt, daß sie deswegen nicht an sich lösten, weil Serumbestandteile sie daran hinderten, die aber bei Anwesenheit des Amboceptors ihre Wirksamkeit wiedergewinnen. Hecker[2]) konnte dies nicht im geringsten bestätigen. Er leugnet die Identität von Seifen und Komplementen. Ich konnte den negativen Befund auch für die Extraktlysine konstatieren. Verbindungen von alkoholischem Organextrakt mit Blutserum, die an sich Hammelblut nicht lösten, lösten es auch nicht, wenn das Blut vorher sensibilisiert wurde.

Noguchi schreibt: „Abgesehen vom langsameren Fortschreiten der Hämolyse als bei den genuinen Komplementen und der höheren Empfänglichkeit für die antikomplementäre Wirkung des Serums könnte man die serumisierten Seifen als Komplemente im Sinne unserer gegenwärtigen biologischen Terminologie auffassen."

Auch die Inaktivierung der serumisierten Seifen glückte Noguchi.

Eine ähnliche Inaktivierung von Organextrakt und Serum gelang mir darzustellen, in dem ich Organextrakt und eine so kleine Menge Serum nahm, die das Extraktlysin nicht mehr hemmte. Fügte ich 1 ccm eines $^1/_{10}$ verdünnten alkoholischen Leberextraktes 1 ccm eines $^1/_{100}$ Menschenserums zu, so löste diese Mischung 1 ccm 5%igen Hammelbluts in 2 Stunden bei

[1]) Noguchi, Über gewisse chemische Komplementsubstanzen. Diese Zeitschr. 6, 327, 1907.

[2]) Hecker, Beiträge zur Kenntnis der hämolytischen Komplemente, Arb. d. Kgl. Inst. f. experim. Ther. Frankfurt, 1907, H. 3.

Blutwärme auf, die Lösung unterblieb aber, wenn Extrakt + Serum vorher auf 56°, oder gar 80° eine halbe Stunde lang erhitzt war. Bei näherer Analyse zeigten sich folgende Verhältnisse:

Tabelle 5.

Mengen des Menschenserums ccm	Hämolyse v. 1 ccm 5%igen Hammelbluts durch 1 ccm 1/10 Orangeextrakt + Menschenserum (alles auf 3 ccm aufgefüllt)
0,1	0
0,05	0
0,025	0
0,01	komplett
0,005	„
0,0025	„
0	„

Nach 2 Stunden 37° notiert.

Tabelle 6.

Mengen des Menschenserums ccm	Hämolyse wie in Tabelle 5, nur daß in der Reihe A Extrakt + Serum zuvor bei Zimmertemperatur, bei 56°, in Reihe C bei 80° 1/2 Stunde erhitzt war								
	A. bei Zimmertemperatur nach			B. 56° nach			C. 80° nach		
	40′	80′	120′	40′	80′	120′	40′	80′	120′
0,01	0	0	komplett	0	0	0	0	0	0
0,005	wenig	komplett	„	0	komplett	komplett	0	0	0
0,0025	mäßig	„	„	0	„	„	0	0	0
0,0015	stark	„	„	komplett	„	„	0	0	komplett
0	komplett	„	„	mäßig	„	„	0	0	wenig

Ich muß noch betonen, daß die zu obigen Versuchen gewählte Dosis Extrakt das Doppelte der gerade noch lösenden Dosis bedeutet. Wir sahen vorher schon, daß die lösende Grenzdosis durch Erhitzen inaktiviert werden kann. Aus obigen Tabellen geht nun zweierlei hervor. Erstlich wird auch diese stärkere Menge des Extraktlysins durch Erhitzen wenigstens zeitlich gehemmt. Zweitens wird eine Mischung von Extrakt und Serum, die an sich noch löst, durch Erhitzen inaktiviert.

Hierher gehören auch die Befunde Landsteiner und

Ehrlichs[1]) bei der Hämolyse durch Ölsäure, die mit kleinen Mengen Pferdeserums versetzt ist. Bei stärkerer Verdünnung und Erhitzen über 65° wurde die Hämolyse gehemmt. Die Autoren wollen daraus schließen, daß die Verbindung Serumeiweiß + Lipoid sich ähnlich wie Amboceptor + Komplement verhält. Es erklären sich Landsteiner und Ehrlichs Befunde im Sinne obiger Tabellen derart, daß sie mit der Extraktmenge an der Grenze der lösenden Dosis angekommen waren, wo eine geringe Serumdose schon hemmt, eine geringere aber schon nach Erhitzen.

Diese letztere Tatsache erinnert an Noguchis oben beschriebenes Phänomen. Diese Erscheinung beruht hiernach darauf, daß das Serum, das an sich schon antilytisch wirkt, beim Erhitzen des Gemisches eine stärkere Wirkung entfaltet. Um so merkwürdiger ist die paradoxe Beobachtung, daß ganz kleine Serummengen (0,0015 ccm in Tabelle 6) beim Erhitzen des Gemisches die lösende Kraft des Extraktlysins beschleunigen und verstärken, eine Tatsache, die im Experimente immer wiederkehrte und für die nur vorläufig eine Erklärung fehlt.

Viel wichtiger erscheint mir ein anderer Befund, daß nämlich einige menschliche Sera in größerer Dosis die Extraktlysine überhaupt nicht mehr hemmen, sondern die Lysis verstärken, ferner daß diese Lösung durch Erhitzen auf 56° aufgehoben wird.

Tabelle 7.

Mengen des Menschenserums ccm	Hämolyse von 1 ccm 5%igen Hamelbluts durch 1 ccm $^1/_{10}$ alkohol. Leberextrakts und Menschenserum W	
	A. sofort	B. nachdem Extrakt + Serum $^1/_2$ Stunde bei 56° erhitzt wurden
1,0	komplett	0
0,5	stark	
0,1	mäßig	
0,05	0	
0,01	0	
0,005	0	
0	komplett	komplett

[1]) Landsteiner u. Ehrlich, Über bactericide Wirkungen von Lipoiden und ihre Beziehung zur Komplementwirkung. Centralbl. f. Bakt. 45, 1908.

Noguchi erörtert die Frage, wie denn solch kräftig wirkende hämolytische Substanzen wie die Extraktlysine im Blute kreisen können, ohne die ihnen innewohnende Wirkung auf die Blutkörperchen auszuüben. Es kommt noch hinzu, daß diese Lysine durchaus nicht spezifisch sind und auch die Blutkörper des Individuums lösen, aus dessen Blut oder Organen sie extrahiert sind. Noguchi greift dabei zu der Erklärung, daß geringe Serummengen schon die hämolytische Wirkung der Extraktlysinen aufheben.

Welcher Art diejenigen Sera sind, welche die Organhämolyse in größeren Mengen fördern, müssen erst weitere Untersuchungen lehren.

Man könnte in erster Linie daran denken, daß diese Sera ein proteolytisches Ferment enthalten, das auch, wie Bayer[1]) gefunden hat, die Hämolyse von Gallensalzen + Serum fördert, während sonst Blutsera, die nicht unter dem Einfluß proteolytischer Verdauungsfermente stehen, auch die Gallenhämolyse hemmen.

Zusammenfassung.

1. Die bei der Wassermannschen Luesreaktion im Luesserum wirksamen Bestandteile fallen beim Dialysieren des Serums mit den Globulinen aus.

2. Ebenso wie Seifen haben auch die komplementbindenden Organextrakte der Wassermannschen Reaktion an sich blutlösende Wirkung, die sich durch Zusatz geringer Serummengen verlieren.

3. Die geringsten lösenden Dosen dieser Extraktlysine werden durch Erhitzen in ihrer hämolytischen Kraft gehemmt resp. geschwächt.

4. Der Kochsalzzusatz spielt bei der Extrakthämolyse eine Rolle, insofern in Rohrzuckerlösung die Hämolyse gehemmt wird.

5. In isotonischer Rohrzuckerlösung versagt auch die Hämolyse von Hammelblut durch den Normalamboceptor des Menschenserums und Meerschweinchenkomplement.

6. Eine Identifizierung der Wirkung von Organextrakten

[1]) Bayer, Untersuchungen über die Gallenhämolyse II. Diese Zeitschr. 9, 58, 1908.

+ Blutserum mit den Serumkomplementen (im Sinne Noguchis) konnte nicht konstatiert werden.

7. Dagegen läßt sich die hämolytische Fähigkeit einer blutlösenden Mischung von Extraktlysinen und kleinen Serummengen durch Erhitzen aufheben, ähnlich der Komplementinaktivierung.

8. Manche Sera haben die Eigenschaft, in größeren Mengen die lytische Kraft der Extraktlysine zu verstärken, in kleinen zu hemmen. Bei 56° wird eine solche Kombination inaktiviert.

Zur Frage über die Umwandlung der Stärke in den Pflanzen und über den Nachweis der amylolytischen Enzyme.

Von

Wl. Butkewitsch.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des Instituts für Land- und Forstwirtschaft in Novo-Alexandria.)

(Eingegangen am 21. April 1908.)

Viele Fragen, welche die gegenseitigen Beziehungen zwischen den Vorgängen der Stärkelösung und -speicherung in den Pflanzen und die Beteiligung einerseits der amylolytischen Enzyme und andrerseits des Plastidenstromas an diesen Vorgängen berühren, haben noch keine befriedigende Lösung gefunden. Der Weg, welchen weitere, die Bedeutung der einzelnen diese Vorgänge bedingende Momente aufzuklärende Untersuchungen einschlagen müssen, besteht in einer Zergliederung des daran beteiligten Faktorenkomplexes und in einer Aufhellung der Rolle, welche jedem einzelnen Faktor dabei zukommt.

Einen Versuch in dieser Richtung bieten die vorliegenden Untersuchungen, in welchen ich bemüht war, das oben angegebene Ziel teilweise durch Anwendung solcher Stoffe, wie Toluol und Chloroform, teilweise durch Einwirkung hoher Temperaturen zu erreichen.[1])

Der Einfluß des Toluols und Chloroforms.

Als Versuchsmaterial dienten mir Holzzweige, welche Ende Februar oder Anfang März, vor Beginn der im Frühling statt-

[1]) Der größte Teil der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche war schon vor vier Jahren, nämlich im Frühjahr 1904, ausgeführt worden.

findenden Stärkeablagerung abgeschnitten waren. Die abgeschnittenen Zweige wurden ins Wasser gestellt und einige Tage bei Zimmertemperatur gehalten, bis die mikroskopische Untersuchung eine Ablagerung von genügenden Stärkemengen in ihrer Rinde zeigte. Nach einer vorläufigen Untersuchung der Stärkeablagerung in den Zweigen verschiedener Baumarten entschied ich mich für Morus alba und Sophora japonica, deren Zweige ich auch bei den folgenden Versuchen hauptsächlich benutzte.

Bei diesen Arten gelang es beim Übertragen der Zweige ins Zimmer verhältnismäßig schnell eine reichliche Stärkeablagerung in der Rinde hervorzurufen. In den natürlichen Bedingungen war die Rinde der Zweige zur Versuchszeit ganz oder beinahe ganz frei von Stärke, und das Holz zeigte immer reichliche Stärkevorräte, welche während der ganzen Winterruheperiode daselbst erhalten blieben (Stärkebäume).[1])

Die im Verlauf einiger Tage im Zimmer aufbewahrten Zweige wurden — um einheitliches und vergleichbares Material zu erhalten — der Länge nach in 2 bis 4 Teile gespaltet. Diese Teile wurden in Gläser mit ein wenig Wasser gestellt und dann unter eine mit schwarzem Papier umhüllte Glasglocke gebracht. Unter jeder Glasglocke, deren Zahl drei betrug, befand sich eine Krystallisierschale mit Wasser. Zu diesem Wasser, dessen Schicht nicht dicker als 3 bis 5 mm war, wurde in eine Schale Toluol, in die andere — Chloroform hinzugefügt. Das Toluol und Chloroform wurden in solcher Menge zugesetzt, daß im Verlaufe des ganzen Versuchs ein Überschuß derselben vorhanden war. Unter der dritten Glocke, welche zur Kontrolle diente, befand sich in der Schale nur Wasser.

Aus den auf diese Weise unter den Glocken verteilten Zweigstücken wurden nach einiger Zeit Quer- und Längsschnitte hergestellt (durch Rinde und Holz), welche mikroskopisch untersucht wurden. Die der vergleichenden Untersuchung unterworfenen Querschnitte wurden durch einander entsprechende Stellen der durch Längsspaltung erhaltenen Teilstücke ein und desselben Zweiges geführt. Bei der Unter-

---

[1]) Vgl. A. Fischer, Beitr. z. Physiol. d. Holzgewächse. Jahrb. f. wiss. Botan. 22, 73, 1891.

suchung auf Stärke wurden die Querschnitte in eine schwache Lösung von Jod in Jodkalium gelegt. In einigen Fällen wurde auch eine mikrochemische Untersuchung der kupferoxydreduzierenden Zuckerarten ausgeführt. Dazu wurden die Querschnitte für einige Zeit in eine starke Lösung von Kupfersulfat gelegt, dann mit Wasser abgespült und in eine siedende Lösung von Seignettesalz und Ätzkali[1]) getaucht, schließlich wieder mit Wasser ausgespült und mikroskopisch untersucht.

In einer Reihe von Versuchen, welche auf die oben erläuterte Weise angestellt waren, konnte in allen Fällen eine und dieselbe Erscheinung festgestellt werden. In Gegenwart des Toluols und Chloroforms löste sich die in der Rinde aufgespeicherte Stärke, und bei genügender Dauer des Versuchs verschwand sie vollständig oder nahezu vollständig. Im Holze von Sophora und Morus, welche sehr reichliche Stärkemengen nicht nur in den Markstrahlen und im Parenchym, sondern auch in den peripherischen Leitelementen enthielten, löste sich die Stärke niemals vollständig, doch konnte man auch hier eine gewisse Abnahme derselben bemerken. Wo unter den Glocken kein Toluol oder Chloroform vorhanden war — wenn die Versuchsobjekte noch vor Ende der Stärkeabscheidungsperiode benutzt wurden —, verminderte sich die Menge der Stärke keineswegs; öfters vergrößerte sie sich im Gegenteil bedeutend, was besonders klar in der Rinde nachzuweisen war.

Mikrochemisch ließen sich mit Hilfe des Fehlingschen Reagenz merkliche Zuckermengen sowohl in den zur Kontrolle aufgestellten Zweigstücken, als auch in denjenigen, welche sich in einer Toluol- oder Chloroformatmosphäre befanden, feststellen.

Im folgenden sind einige der bei meinen Versuchen mit Zweigstücken von Morus alba und Sophora japonica erhaltenen Ergebnisse mitgeteilt. Zu diesen Versuchen wurden 2 bis 3 jährige Zweige genommen, welche Ende Februar oder Anfang März abgeschnitten und einige Tage im Zimmer ausgehalten waren.

---

[1]) Nach A. Mayer, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1885, 332. Siehe Strasburger, Das botanische Praktikum 1897, 139.

Versuche mit Toluol.

A. Ein Zweig von Morus alba ist am 22. II. abgeschnitten und 3 Tage im Zimmer bei einer Temperatur von 17 bis 20° C gehalten. Ziemlich viel Stärke sowohl im Holz als auch in der Rinde vorhanden. Die Zweige sind der Länge nach gespaltet und unter Glasglocken mit und ohne Toluol gestellt worden, wo sie drei Tage verblieben.

Die Resultate der mikroskopischen Untersuchung

ohne Toluol:	mit Toluol:
Viel Stärke sowohl im Holz als auch in der Rinde.	In der Rinde beinahe keine Stärke, im Holz ziemlich viel.

B. Ein Zweig von Morus alba, am 2. III. abgeschnitten und 4 Tage im Zimmer gehalten. Viel Stärke in Rinde und Holz. 2 Tage unter Glasglocken mit und ohne Toluol gehalten.

Resultate der mikrochemischen Untersuchung

ohne Toluol:	mit Toluol:
Viel Stärke in Holz und Rinde.	Im Holz ziemlich viel, in der Rinde wenig Stärke.

In beiden Fällen bedeutende Mengen einer reduzierenden Zuckerart sowohl im Holz als auch in der Rinde.

C. Ein Zweig von Sophora japonica, am 2. III. abgeschnitten und einige Tage im Zimmer gehalten. Im Holz sehr viel Stärke, in der Rinde stellenweise, hauptsächlich in den Markstrahlen. 2 Tage unter der Glocke.

Resultate der mikrochemischen Untersuchung

ohne Toluol:	mit Toluol:
Wie früher.	Im Holz viel Stärke, in der Rinde keine.

Versuche mit Chloroform.

D. Ein Zweig von Morus alba, am 3. III. abgeschnitten, 3 Tage im Zimmer gehalten. Im Holze viel Stärke, in der Rinde zerstreut, stellenweise. 4 Tage unter Glasglocke mit und ohne Chloroform.

Mikrochemische Untersuchung

ohne Chloroform:	mit Chloroform:
Viel Stärke im Holz und ziemlich viel in der Rinde.	Im Holz ziemlich viel, in der Rinde keine Stärke.

Reduzierender Zucker in beiden Fällen, hauptsächlich in der Rinde.

E. Zweig von Sophora japonica, am 22. III. abgeschnitten, einige Tage im Zimmer gehalten. Sehr viel Stärke im Holz, ziemlich viel in der Rinde. 4 Tage unter den Glasglocken.

Mikrochemische Untersuchung

ohne Chloroform:	mit Chloroform:
Sehr viel Stärke in Holz und Rinde.	Im Holz ziemlich viel, in der Rinde beinahe keine Stärke (nur im peripherischen, chlorophyllführenden Teil).

Aus den angeführten Ergebnissen sieht man, daß Toluol und Chloroform die Lösung der in den Zellen gespeicherten Stärke hervorriefen.

Eine ähnliche Erscheinung ist auch von Puriewitsch[1]) für Blätter, welche der Einwirkung von Äther ausgesetzt werden, festgestellt. Die von diesem Autor beschriebene Erscheinung des beschleunigten Verschwindens der Blätterstärke unter dem Einfluß des Äthers wurde in dem Sinne erklärt, daß der Äther die Atmungsenergie steigern und dadurch den Verbrauch des bei der Stärkelösung entstehenden Zuckers, dessen Anhäufung auf diesen Vorgang hemmend wirke, beschleunigen sollte.[2]) Dieselbe Erklärung könnte auch auf die ähnliche Wirkung des Toluols und Chloroforms in meinen Versuchen ausgedehnt werden. Doch die Bedingungen, unter welchen diese Versuche ausgeführt wurden, ließen an der Anwendbarkeit einer solchen Erklärung in diesem Falle zweifeln. Nach den vorhandenen Angaben[3]) übt Äther und Chloroform nur in kleinen Mengen und bei kurzer Einwirkungsdauer eine stimulierende Wirkung auf den Atmungsprozeß aus. Bei der langen Einwirkungszeit des Chloroforms und Toluols in meinen Versuchen mußte man aber auf Grund dessen, was uns über den Einfluß dieser Stoffe auf die Atmung[4]) bekannt ist, die umgekehrte Erscheinung, d. h. eine Verminderung der Atmungsenergie erwarten. Zugleich, wie schon oben erwähnt, erwies die mikrochemische Untersuchung der von Toluol und Chloroform beeinflußten Objekte das Vorhandensein von bedeutenden Mengen reduzierender Zuckerarten. Diese Untersuchungsmethode ist aber natürlich für die Beurteilung der relativen Zuckermenge ungenügend. Um genauere Resultate zu erhalten, stellte ich

[1]) K. Puriewitsch, Zur Frage über die Anhäufung und Auflösung der Stärke in der Pflanzenzelle, Kiew 1898 (russisch). Dieselbe Wirkung des Äthers konstatieren in einer unlängst erschienenen Arbeit auch Reinhardt und Suschkow, Beiträge zur Stärkebildung in der Pflanze (Beiträge z. Bot. Centralbl. 18, 133, 1905.

[2]) N. Morkowin, Über den Einfluß der anästhesierenden und giftigen Stoffe auf die Atmung der höheren Pflanzen, 1901 (russisch).

[3]) Zaleski, Zur Frage über den Einfluß der Reize auf die Atmung der Pflanzen, 1902 (russisch).

[4]) Zaleski l. c., Butkewitsch, Über die regressive Metamorphose von Eiweißstoffen in den höheren Pflanzen usw. 1904 (russisch).

einen Versuch an, in welchem eine quantitative Bestimmung des Zuckers nach Soxhlets Filtriermethode ausgeführt wurde.

Die vom Holze abgelöste Rinde eines ein paar Tage im Zimmer gehaltenen Zweiges von Sophora japonica wurde in Streifen von ca. 10 cm Länge und 1 cm Breite gespalten. Aus der auf diese Weise gespalteten Rinde wurden drei gleiche Proben zu je 20 g genommen. Jede Probe wurde in ein Glas mit ein wenig Wasser gestellt, wobei die Rindenstücke mit dem unteren Ende ins Wasser tauchten, und die Gläser unter Glasglocken verteilt (Toluol, Chloroform und Kontrollglocken). Nach dreitägigem Verweilen unter den Glasglocken bei gewöhnlicher Temperatur (18 bis 20°) wurde die Rinde zerkleinert, mit heißem Wasser extrahiert und in dem Auszug der reduzierende Zucker bestimmt. Es wurde auch der Zuckergehalt der anfangs zum Versuche genommenen Rinde bestimmt. Bei der Zuckerbestimmung wurde der wässerige Auszug zuerst von den Gerbstoffen durch Fällung mit essigsaurem Blei befreit, das überschüssige Blei mit Schwefelsäure entfernt und die abfiltrierte Flüssigkeit zum Filtrieren mittelst der Fehlingschen Lösung benutzt. In den analysierten Rindenproben wurden folgende Zuckermengen, auf Glucose berechnet, gefunden:

	Anfangs	Unter den Glocken gehalten.		
		Kontrolle	Toluol	Chloroform
Rinde genommen	30 g		je 20 g	
Zucker gefunden	0,327 g	0,209 g	0,447 g	0,334 g
Zuckermenge in 100 g Rinde	1,09 g	1,05 g	2,24 g	1,67 g

Aus den angeführten Zahlen ist zu ersehen, daß die vom Toluol und Chloroform hervorgerufene Auflösung der Stärke von einer Zuckeranhäufung begleitet wird. Dadurch fällt die früher erwähnte Annahme, wonach die Einwirkung des Toluols und Chloroforms auf einen gesteigerten Verbrauch der Produkte der Stärkeumwandlung bei der Atmung zurückgeführt wird.

In Gegenwart des Toluols und Chloroforms häufte sich der Zucker in solchen Mengen an, welche seinen Gehalt unter normalen Verhältnissen bedeutend übertrafen. Da bei normalen Bedingungen die Anhäufung des Zuckers durch eine gewisse Grenze beschränkt ist, weil beim Überschreiten dieser Grenze der überschüssige Zucker in Stärke verwandelt wird, so ent-

stand natürlicherweise die Annahme, daß die Wirkung des Toluols und Chloroforms in der Unterdrückung der diese Verwandlung aufrechterhaltenden synthetischen Tätigkeit der stärkebildenden Plastiden bestehen müsse.[1])

Das Chloroform und Äther in der Tat einen derartigen hemmenden Einfluß ausüben, darauf finden sich einige Hinweise bei Puriewitsch[2]) und Winkler[3]). Nach Angaben dieser Autoren findet in Gegenwart von Äther und Chloroform keine Stärkespeicherung in den Pflanzenzellen statt, auch nicht in Zuckerlösungen von bedeutender Konzentration.

Dieselbe Erscheinung in Gegenwart von Toluol und Chloroform konnte auch ich in einem Versuch mit Lindenrinde feststellen.[4]) Unter einer Glocke mit Toluol konnte keine Stärkeabscheidung beobachtet werden; sie konnte auch nicht in denjenigen Fällen beobachtet werden, wo die Rinde in eine 10 $^0/_0$ige Glucoselösung gelegt wurden. Ohne Toluol und Chloroform waren in der Rinde am 3. bis 4. Tage nach der Übertragung ins Zimmer bedeutende Stärkemengen abgelagert, wobei die Glucoselösung eine ganz deutliche Wirkung erkennen ließ.

Die angeführten Tatsachen sprechen für die früher geäußerte Annahme, daß die Wirkung des Toluols und Chloroforms, welche sich in der Lösung der Stärke und in einer Anhäufung von Zucker äußert, durch eine Abschwächung oder Sistierung der synthetischen Tätigkeit der stärkebildenden Plastiden bedingt sei.

---

[1]) Johanssen fand, daß in reifenden Samen die normalerweise stattfindende Zuckerverminderung durch Äther aufgehalten werden kann und daß unter der Nachwirkung der Narkose eine erhebliche Zuckeransammlung nachzuweisen ist; Crocusknollen verlieren unter der direkten Einwirkung des Äthers Zucker und erst unter der Nachwirkung ist auch hier eine deutliche Zunahme zu beobachten. Cit. nach W. Wächter, Untersuchungen über den Austritt von Zucker aus den Zellen der Speicherorgane von Allium Cepa und Beta vulgaris. Jahrb. f. wiss. Bot. **41**, 163, 199, 1905.

[2]) K. Puriewitsch, l. c.

[3]) H. Winkler, Untersuchungen über die Stärkebildung in den verschiedenartigen Chromatophoren. Jahrb. f. wiss. Bot. **32**, 530, 1898.

[4]) Zu diesem Versuche wurde Linde benutzt, weil zu dieser Zeit in der Rinde von Sophora und Morus die Stärke schon abgelagert war. Bei diesen Bäumen beginnt die Frühlingsperiode der Stärkeabscheidung früher, als bei der Linde.

In letzterer Beziehung zeigt die Wirkung des Toluols und Chloroforms eine gewisse Analogie mit der Wirkung der niedrigen Temperaturen, unter deren Einfluß, wie eine ganze Reihe von Beobachtungen lehrt[1]), ebenfalls eine Lösung der Stärke und eine gleichzeitige Anhäufung von Zucker stattfindet. Hier haben wir es auch mit der Abschwächung der synthetischen Tätigkeit der Plastiden zu tun, welche, wie Czapek gezeigt hat[2]), bei Temperaturen von ca. 0° höhere Zuckerkonzentrationen für die Entfaltung ihrer stärkebildenden Tätigkeit verlangen, als bei 16 bis 18°.

Bei der Anstellung der folgenden Versuche hatte ich die Lösung der natürlicherweise auftauchenden Frage im Auge, ob dieselben Erscheinungen der Stärkeauflösung und Zuckerspeicherung, welche einerseits durch Toluol und Chloroform, andererseits durch Erniedrigung der Temperatur hervorgerufen werden, nicht auch durch Erhöhung der Temperatur über den Optimalpunkt der Stärkeabscheidung und Atmung erreicht werden könnten. Als ich meine Versuche begann, waren über die Wirkung der dem Atmungsoptimum nahen Temperaturen auf die Abscheidung der Stärke nur die Angaben von Winkler[3]) vorhanden. In seiner schon früher erwähnten Arbeit findet sich der kurze Hinweis darauf, daß „die oberhalb des Minimums (zur Stärkebildung) gelegenen Temperaturen sich bis ca. 20° C um so günstiger erwiesen, je höher sie waren, Temperaturen über 20° aber lassen keine weitere Steigerung der in gleicher Zeit gebildeten Stärkemenge erkennen". „Die obere Grenztemperatur" — sagt er weiter — „fällt mit derjenigen für die Lebensmöglichkeit überhaupt sehr nahe zusammen: noch bei 45° C vermochte ich in mehreren Fällen Stärkebildung nachzuweisen".[4])

---

[1]) Leclerc du Sablon, Compt. rend. **135**, 866, 1902.

F. Czapek, Biochem. d. Pflanzen, **1**, 379 u. 387, 1905; vgl. auch B. Niklewski, Beiträge bot. Centr. **19**, Abt. 1, 68, 1905,

[2]) F. Czapek, Der Kohlenhydratstoffwechsel der Laubblätter im Winter, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **19**, 120, 1901.

[3]) H. Winkler, l. c. 529.

[4]) Vgl. auch W. Wächter, Über das Verhältnis der in den Zwiebeln von Allium Cepa vorkommenden Zuckerarten. Jahrb. f. wiss. Bot. **45**, 232, 1907. Er fand Stärkekörner in Zwiebeln von Allium Cepa, die einer Temperatur von 35° C bis 44° C ausgesetzt waren.

Die Wirkung der hohen Temperaturen.

Ich begann meine Versuche mit Temperaturen von 50°. Die vom Holz abgelöste Rinde von Sophora japonica wurde, wie auch früher, in Streifen geschnitten. Aus den auf diese Weise erhaltenen Streifen wurden zwei Proben von gleichem Gewicht (zu 30 g) genommen. In einer Probe wurde die Zuckerbestimmung sofort ausgeführt. Die andere wurde in ein Gläschen mit etwas Wasser gebracht, in ein Glas mit angeschliffenem Stöpsel gestellt und 7 Stunden im Thermostaten bei einer Temperatur von 50° gehalten; dann wurde auch in dieser Probe der Zucker bestimmt[1]).

Es wurden folgende Zuckermengen (auf Glucose berechnet) gefunden.

	Unmittelbar genommen	Im Thermostaten bei 50° 7 Stunden gehalten
In der zum Versuch genommenen Rinde (30 g)	0,327 g	0,751 g
In 100 g Rinde	1,09 „	2,50 „

Die mikroskopische Untersuchung der im Thermostaten gehaltenen Rinde erwies darin das Vorhandensein von einer gewissen Stärkemenge.

In den folgenden Versuchen wurde die Rinde von Sophora bei denselben Bedingungen längere Zeit gehalten.

		18 Stunden bei 50°
Glucose	in 20 g Rinde . . .	0,408
	„ 100 „ „ . . .	2,04.

Bei mikroskopischer Untersuchung wurde keine Stärke gefunden, aber sowohl in der Rinde, als auch im Wasser, worin die Rindenstücke standen, waren Bakterien enthalten. Die Entwicklung der Bakterien und teilweise vielleicht auch die Atmung, welche in den Versuchsobjekten noch anhielt, hatte wahrscheinlich den Umstand zur Folge, daß, trotzdem die Stärke vollständig gelöst war, weniger Zucker als früher gefunden wurde. Daß die Atmung bei 50° nicht aufhörte, konnte man nach

---

[1]) Sowohl in diesem, als auch in den folgenden Versuchen wurde die Zuckerbestimmung nach derselben Methode ausgeführt, welche schon früher beschrieben worden ist.

den Versuchen von Clausen[1]), Ziegenbein[2]) und Stoklasa[3]) annehmen, welche in ihren Versuchsobjekten eine bedeutende Kohlensäureausscheidung noch bei dieser Temperatur feststellten.

Um die Bakterien fernzuhalten, wurde im folgenden Versuche in das Glas, welches zur Aufnahme der Rinde diente, Chloroform in Überschuß zugesetzt. Zum Versuch wurde eine Portion der Sophorarinde von 20 g genommen; in einer gleichen Portion wurde auch der ursprüngliche Zuckergehalt bestimmt.

		Rinde unmittelbar genommen	Rinde 19 Stunden bei 50° mit Chloroform gehalten
Glucose	in 20 g Rinde .	0,192 g	0,680 g
	„ 100 „ „ .	0,96 „	3,40 „

Bei mikroskopischer Untersuchung konnte in der im Thermostaten gehaltenen Rinde keine Stärke gefunden werden.

Nachdem ich mich von der raschen Verzuckerung der Stärke bei 50° überzeugt hatte, ging ich zu Versuchen mit höheren Temperaturen über. Ebenso wie früher (ohne Chloroform) wurden mit der Sophorarinde zwei Versuche angestellt bei Temperaturen von 68° und 83°.

Die Zuckerbestimmung in der zum Versuch genommenen Rinde und der im Thermostaten 20 Stunden bei den angeführten Temperaturen ausgehaltenen ergab folgende Resultate.

	Unmittelbar	Nach 20stündigem Verweilen bei 68°	bei 83°
In 20 g Rinde . .	0,198 g	0,575 g	0,260 g
„ 100 „ „ . .	0,99 „	2,88 „	1,30 „

Beim Versuch bei 68° wurde in der Rinde keine Spur von Stärke gefunden. Die bei 83° gehaltene Rinde enthielt auch keine echte Stärke, welche Blaufärbung mit Jod zeigte, aber ihre Zellen waren mit einer Masse gefüllt, welche durch

[1]) H. Clausen, Beiträge zur Kenntnis der Atmung der Gewächse und des pflanzlichen Stoffwechsels. Landw. Jahrb. **19**, 893, 1890.

[2]) E. Ziegenbein, Untersuchungen über den Stoffwechsel und die Atmung keimender Kartoffelknollen, sowie anderer Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot. **25**, 563, 1893.

[3]) J. Stoklasa, Jelinek und Vitek, Der anaerobe Stoffwechsel der höheren Pflanzen und seine Beziehung zur alkoholischen Gärung. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 460, 1903.

Jod violettrot gefärbt wurde und augenscheinlich aus mit Jod färbbaren Dextrinen bestand. Es ging also bei 83° ein verhältnismäßig kleiner Teil der Stärke in Fehlingsche Lösung reduzierende Körper über, die Hauptmasse der Stärke verwandelte sich dagegen in Dextrine.

Die schnelle Lösung und Verzuckerung der Stärke bei Temperaturen um 70° herum und die Abschwächung dieses Vorganges bei 83° ließen auf die Teilnahme eines stärkelösenden Enzyms an diesem Vorgange schließen. Die Möglichkeit einer etwaigen Säurewirkung wurde durch die obenerwähnte Abschwächung der Verzuckerung bei 83° widerlegt. Gegen eine solche Behauptung sprach auch ein von mir gemachter Versuch, in welchem die Rinde einem vorläufigen kurzen (zirka 5 Minuten langen) Erhitzen im Kochschen Apparat unterworfen wurde. Die so behandelte Rinde zeigte nach einem 25stündigem Verweilen im Thermostaten bei 80° nicht die geringste Veränderung hinsichtlich der in ihr enthaltenen Stärke. Ihre Zellen waren sowohl vor, als auch nach dem Aufenthalt im Thermostaten von einer Stärkemasse erfüllt, welche mit Jod die charakteristische Blaufärbung zeigte.

Nach den oben beschriebenen Versuchen blieb schon kein Zweifel darüber übrig, daß in der Rinde ein stärkeverzuckerndes Enzym enthalten sei, wobei die Versuche mit hohen Temperaturen die Annahme wahrscheinlich machten, daß dieses Enzym nach den Bedingungen seiner Wirkung der Malzdiastase nahe verwandt sein dürfte. Es gleicht der Diastase sowohl in bezug auf das hohe Temperaturmaximum seiner Tätigkeit, als auch in bezug auf die Veränderung des Charakters der Reaktion bei einer Erhöhung der Temperatur über 70° (vornehmliche Bildung und Anhäufung von Dextrinen).[1])

Das amylolytische Enzym der Rinde.

Für die folgenden Versuche wurde die stärkereiche Rinde von Sophora japonica und Robinia Pseudacacia genommen. Die frische, vom Holze abgelöste Rinde wurde auf einem einfachen Reibeisen zerkleinert und aus der auf diese

[1]) Vgl. E. Duclaux, Traité de Microbiologie 2, 400 u. 418, 1899. — C. Oppenheimer, Die Fermente, 1903, 206.

Weise erhaltenen Masse zwei Portionen von gleichem Gewicht genommen, zu 1 g jede. Beide wurden in Reagenzgläser gelegt, je 10 ccm Wasser zugegeben und nach kurzem Erwärmen eines von den Gläsern auf 100° beide in den Thermostaten bei 58 bis 60° gestellt.

In beiden Versuchen mit den Rinden von Sophora und Robinia war in den nicht erhitzten Proben schon nach 1 Stunde weder mikro- noch makrochemisch (mit Jod) eine Spur von Stärke oder durch Jod färbbares Dextrin nachweisbar. In den vorher erhitzten Proben blieb dagegen die Stärke unverändert.

Die rasche Lösung der Stärke in diesen Versuchen im Vergleich zu den vorhergehenden hängt offenbar davon ab, daß dank der Zerkleinerung der Rinde die Lösungsprodukte leichter ins Wasser übertreten konnten.

Bei den Versuchen mit zerkleinerter Rinde, bei welchen auch die aus den beim Zerreiben verletzten Zellen herausgefallenen Stärkekörner gelöst wurden, konnte ich mich u. a. davon überzeugen, daß das in den Rindenzellen enthaltene Enzym auch ins Wasser übertritt.

Daraufhin machte ich den Versuch, das durch die vorgehende Untersuchung nachgewiesene Enzym aus der Rinde zu isolieren, und benutzte dazu das gewöhnliche Verfahren, welches zum Gewinn der Malzdiastase angewandt wird — Ausziehen mit Wasser und Fällen mit Alkohol.

50 g der bei 40 bis 45° getrockneten und fein zerriebenen Robiniarinde wurden mit 250 ccm Wasser vermengt und etwas Toluol hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurde die Flüssigkeit durch Leinwand abgepreßt und durch ein Papierfilter filtriert. Der auf diese Weise erhaltene Auszug zeigte eine sehr energische Wirkung auf Stärkekleister.

Eine Mischung von 20 ccm eines 3%igen Kartoffelstärkekleisters mit 10 ccm des Auszugs gab nach 1 Stunde bei 60° nicht die geringste Färbung mit Jod.

Nach dieser vorläufigen Prüfung wurden 100 ccm des Auszugs mit 300 ccm 96%igem Alkohol gemischt. Nach 24 Stunden wurde der dabei entstandene reichliche flockige Niederschlag nach Dekantation der darüber befindlichen Flüssigkeit abfiltriert, mit Alkohol und Äther abgewaschen und im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Auf diese Weise wurde ca. 1 g Trocken-

substanz erhalten. Das erhaltene Präparat war in Wasser (bis auf einen gewissen Rest) löslich und gab die für Eiweißkörper charakteristischen Reaktionen, bestand also offenbar hauptsächlich aus dergleichen Körpern.[1]) Bei der Einwirkung auf Stärkekleister rief eine wässerige Lösung dieses Präparats eine rasche Verzuckerung der Stärke hervor.

0,1 g des auf oben beschriebene Weise erhaltenen Präparats wurden in 1 ccm Wasser gelöst und zu dieser Lösung 10 ccm 3%iger Stärkekleister hinzugefügt. Nach $^1/_2$stündigem Verweilen im Thermostaten bei 60° gab diese Mischung gar keine Reaktion mit Jod und reduzierte stark die Fehlingsche Lösung.

Ein ebenso energisch wirkendes Präparat eines diastatischen Enzyms gelang es mir auch aus der Rinde der gelben Akazie (Caragana arborescens) zu erhalten. Zur Untersuchung wurde, wie auch früher, die Rinde von jungen (3 bis 4jährigen) Zweigen im April, während der Frühlingsperiode der Stärkeauflösung, genommen. Bei der Prüfung der Wirkungsweise des aus dieser Rinde erhaltenen Enzyms auf Stärkekleister konnte ebenfalls eine reichliche Entstehung von Produkten, welche die Fehlingsche Lösung reduzierten, nachgewiesen werden.

Weiter wurden Versuche behufs Lösung der Frage über die Natur der Endrodukte angestellt, welche durch das Rindenenzym bei der Verzuckerung der Stärke erzeugt werden.

Es mußte entschieden werden, ob die Verzuckerung der Stärke nur bis zur Maltose vor sich geht, oder ob die dabei gebildete Maltose weiter bis zur Bildung von Glucose gespaltet wird. Die Untersuchung dieser Frage begann ich damit, daß ich die Fähigkeit des aus der Robiniarinde isolierten Präparats, Maltose zu invertieren, prüfte.

In zwei Kölbchen wurden je 0,1 g des Enzympräparats und je 10 ccm Wasser gebracht, dann eines von den Kölbchen kurze Zeit in einem kochenden Dampfbade erhitzt und in beide je 10 ccm einer 5%igen Maltoselösung und etwas Toluol hinzugefügt. Nachdem beide Kölbchen 42 Stunden im Thermo-

[1]) Der reiche Gehalt des Rindenauszugs an Eiweißstoffen war leicht beim Erwärmen desselben nachzuweisen. Dabei fielen die Eiweißstoffe als voluminöser flockiger Niederschlag aus, welcher die ganze Flüssigkeit ausfüllte.

staten bei 40 bis 42° gehalten waren, wurden beide Flüssigkeiten auf ein Volum von je 50 ccm gebracht und zum Titrieren der Fehlingschen Lösung verwandt. Beim Titrieren konnte kein nennenswerter Unterschied bemerkt werden; in beiden Fällen wurden auf 10 ccm Fehlingsche Lösung $9^1/_2$ bis 10 ccm der Versuchsflüssigkeit verbraucht.

In Betracht dessen, daß das negative Resultat des eben beschriebenen Versuchs nicht durch die Abwesenheit eines Maltose invertierenden Enzyms, sondern durch seinen Übergang in einen unwirksamen Zustand unter Einwirkung des Alkohols bedingt sein könnte, stellte ich noch zwei Versuche mit einem wässerigen Auszug aus der Rinde und auch mit der Rinde selbst an.

Für diese Versuche wurde die Rinde von einem Zweig der Robinia Pseudacacia benutzt, welcher im Zimmer bis zum vollen Verschwinden der Stärke in seiner Rinde gehalten wurde.

20 g der getrockneten und zerriebenen Rinde wurden mit 50 ccm Wasser vermischt und etwas Toluol hinzugefügt. Nach einigen Stunden wurde die Flüssigkeit abgepreßt und abfiltriert. Zum Versuch wurden zwei Portionen des Auszugs zu je 10 ccm genommen, eine von ihnen gekocht und zu beiden je 10 ccm einer 5%igen Maltoselösung und Toluol hinzugefügt.

In einem anderen Versuch wurde die frische Rinde von einem Zweig desselben Baumes in Stücke geschnitten und dann zwei Portionen zu je 5 g davon genommen; dazu wurden je 10 ccm Wasser hinzugegeben und nach kurzem Erhitzen einer von den Proben zu beiden nach 10 ccm einer 5%igen Maltoselösung und Toluol zugegossen.

Alle Kohlen sowohl mit dem Auszug, als auch mit der Rinde wurden in den Thermostaten bei 40 bis 42° gestellt und 40 Stunden lang darin gehalten. Dann wurde die Flüssigkeit in allen Kolben bis auf 50 ccm gebracht und zum Titrieren der Fehlingschen Lösung benutzt.

Das Titrieren ergab folgende Resultate:

Versuche mit dem Auszug.

	gekocht	nicht gekocht
Fehlingsche Lösung	10 ccm	10 ccm
Versuchsflüssigkeit	$9^1/_2$—10 ccm	$7^1/_2$—8 ccm

Ca. 60% der Maltoso invertiert.

Versuch mit der Rinde.

	gekocht	nicht gekocht
Fehlingsche Lösung	10 ccm	10 ccm
Versuchsflüssigkeit	$9^1/_2$—10 ccm	6—$6^1/_2$ ccm

Ca. 80% der Maltose invertiert.

Die angeführten Ergebnisse sprechen also für das Vorhandensein eines Maltose invertierenden Enzyms in der Rinde.

Die Abwesenheit eines solchen Enzyms im Präparat, welches mit Hilfe von Alkohol gewonnen war, erklärt sich wahrscheinlich dadurch, daß unter dem Einfluß des letzteren das Enzym in einen unwirksamen Zustand übergeht. In dieser Beziehung gleicht das maltosespaltende Enzym der Rinde der Hefe- und Malzmaltase, welche unter dem Einfluß von Alkohol ebenfalls leicht seine Aktivität einbüßt.[1])

Durch die von mir aufgefundene Tatsache der Anwesenheit eines maltosespaltenden Enzyms in der Rinde findet auch die bis jetzt wenig gestützte Ansicht ihre Bestätigung, daß das Endprodukt der Stärkespaltung in Rinde und Holz die Glucose ist, in welcher Form auch hauptsächlich der Transport der aufgespeicherten Kohlenhydrate vor sich geht.

Eine neue Methode zum Nachweis eines amylolytischen Enzyms in den pflanzlichen Geweben.

Die oben beschriebenen Versuche mit der Rinde bei hohen Temperaturen führten uns zu dem Schluß von der Anwesenheit eines stärkelösenden Enzyms, einem Schlusse, welcher durch die folgenden Untersuchungen auch bestätigt wurde. In solchen Versuchen, welche im Nachweis einer Lösung der in den Zellen gespeicherten Stärke bestehen, bei einer Temperatur von ca. 70° haben wir überhaupt ein sehr einfaches und bequemes Mittel zur Entscheidung der Frage über die Anwesenheit eines diastatischen Enzyms in den stärkeführenden pflanzlichen Geweben. Wir haben die Möglichkeit, diese einfache Methode zum Nachweis eines stärkelösenden Enzyms anzuwenden, dank der hohen Maximaltemperatur seiner Wirksamkeit, welche die

[1]) Über Maltsae oder Glucase der Hefe s. F. Röhmann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 27, 1894 und E. Fischer, ibid. 3479; über Malzmaltase, Brasse, ibid. 18, 197, 1885 und An. Pugliese, Arch. f. Physiol. 69, 115, 1897.

Grenzen, die eine Tätigkeit des lebenden Protoplasten noch zulassen könnten, bei weitem überschreitet.

Die hier vorgeschlagene Methode hat gegenüber der von Brown und Morris[1]) zum selben Zwecke angewandten den Vorzug nicht nur größerer Einfachheit, sondern auch größerer Empfindlichkeit. Davon habe ich mich durch vergleichende Versuche mit der Rinde einiger Bäume überzeugt. Neben dem oben beschriebenen Versuche bei hoher Temperatur wurde auch eine Reihe von Versuchen unternommen, welche ihrer Anstellung nach denjenigen von Brown und Morris ähnlich waren, mit jenem Unterschiede, daß statt der von diesen Autoren benutzten löslichen Stärke Stärkekleister angewandt wurde.

Die bei 40° getrocknete und zerriebene Rinde wurde mit einer kleinen Menge Wasser vermischt, diese Mischung in einen Kolben mit einem 5%igen Stärkekleister gebracht und nach Zugabe von Toluol der mit einem Stopfen verschlossene Kolben in ein Dampfbad gestellt, in welchem die Temperatur auf ca. 60° eingestellt war.

Alle auf diese Weise mit der Rinde von Papilionaceen (Sophora japonica, Robinia pseudacacia, Caragana arborescens) angestellten Versuche gaben übereinstimmend mit den Beobachtungen über die Lösung der darin enthaltenen Stärke positive Resultate. 3 bis 5 g Rinde riefen beim Vermischen mit 100 ccm eines 5%igen Stärkekleisters eine rasche Verflüssigung und Verzuckerung des letzteren hervor. Wenn die Rinde in den vorher auf 60° erwärmten Kleister eingetragen wurde, so verwandelte sich der dicke, opaleszierende Kleister schon nach 10 bis 15 Minuten in eine leicht bewegliche durchsichtige Flüssigkeit. Nach einer Stunde war die Reaktion auf Stärke verschwunden; mit Jod erhielt man eine violette oder rotviolette Färbung, welche allmählich in eine rein rote überging; nach 4 bis 5 Stunden verschwand gewöhnlich auch diese Dextrinreaktion und die Flüssigkeit übte eine stark reduzierende Wirkung auf die Fehlingsche Lösung aus.

Ganz andere Resultate erhielt ich zur selben Zeit mit der auf dieselbe Weise behandelten Rinde von Populus nigra. Bei einer ähnlichen Versuchsanstellung behielt der Kleister, wenn

[1]) Brown and Morris, Contribution of the chemistry and physiology of foliage leaves. Journ. of the Chem. Soc. 63, 604, 1893.

er auch etwas verdünnt erschien, noch nach 12 Stunden die Stärkereaktion. Wenn ich Rindenstücke vom selben Baume (vom Holz abgelöst) in einem Thermostaten bei 70° brachte, so wurde nach 3 bis 4 Stunden die in ihren Zellen enthaltene Stärke vollkommen gelöst, was auf die Anwesenheit eines amylolytischen Enzyms deutete.

Die Anwesenheit dieses Enzyms konnte auch bei der Prüfung der Einwirkung der Populus nigra-Rinde auf Stärkekleister erwiesen werden, wenn die Rinde dabei nicht in getrocknetem, sondern in frischem Zustande benutzt wurde. In 10 ccm eines $3^0/_0$igen Stärkekleisters mit 5 g frisch zerriebener Rinde war schon nach 2 Stunden bei ca. 60° keine Stärkereaktion mehr nachzuweisen. Jod ergab nur eine Rotfärbung. Bei weiterem Aufenthalt im Thermostaten verschwand diese Reaktion noch lange nicht, und konnte noch nach 24 Stunden nachgewiesen werden.

Die angeführten Tatsachen beweisen, daß in der Rinde von Populus nigra ein stärkelösendes Enzym vorhanden ist, welches seine Tätigkeit nur in frischer Rinde ausübt. Das negative Resultat mit der getrockneten Rinde ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß das Enzym beim Trocknen seine Aktivität unter dem Einfluß der Gerbstoffe verliert, welche in der Rinde der Populusarten reichlich enthalten ist.

Die von mir vorgeschlagene Methode für den Nachweis eines amylolytischen Enzyms in pflanzlichen Objekten durch Feststellen einer Lösung der darin gespeicherten Stärke bei einer Temperatur von 60 bis 70° wurde von mir außer der Rinde auch noch auf einige andere Objekte ausgedehnt, nämlich auf Holz und Blätter.

Versuche mit dem Holze von Sophora japonica.

I. Ein frischer 3—4jähriger Zweig von Sophora japonica, welcher Anfang Mai abgeschnitten war, wurde von der Rinde befreit, in Stücke von 3 cm Länge geschnitten und jedes Stück in vier Längsstreifen gespaltet. Die auf diese Weise enthaltenen Teilstücke wurden in zwei Portionen zu 15 g jede geteilt. Jede Portion wurde in ein Glas gelegt, die eine von beiden im Kochschen Sterilisierungsapparat kurz erhitzt und zu beiden je 100 ccm Chloroformwasser zugegossen. Die Gläser wurden

fest verschlossen und in einem Thermostaten bei 68° auf 15 Stunden gestellt. Nach Beendigung des Versuchs wurde auch die andere Portion im Sterilisierapparat erhitzt.

Die Jodprobe ergab in dem Holze der I. Portion überall reichliche Stärkemengen, in dem Holze der II. Portion dagegen war die Stärke nur hin und wieder, stellenweise erhalten.

Die Bestimmung des Fehlingsche Lösung reduzierenden Zuckers in der abfiltrierten Flüssigkeit ergab folgende Resultate:

		I (erhitzt)	II (nicht erhitzt)
Zucker (Glucose)	Auf die beim Versuch angewandte Menge	0,13 g	0,44 g
	Auf 100 g frisches Holz	0,90 „	5,00 „

Ein Teil des Zuckers war noch im Holz enthalten, welches einem weiteren Auslaugen nicht unterworfen wurde.

II. Zu diesem Versuche wurde ein 8- bis 10jähriger Zweig von Sophora japonica benutzt, welcher Anfang April abgeschnitten worden war und ungefähr einen Monat im Zimmer in entrindetem Zustande gelegen hatte. Die mikroskopische Untersuchung erwies das Vorhandensein großer Stärkemengen, besonders im peripherischen Teil. Zum Versuch wurden aus diesem Teil mit einem Messer abgespaltete Späne benutzt. Von diesen Spänen wurden 2 Portionen zu 15 g benutzt, jede wurde in ein Glas gelegt, dann eine von beiden im Sterilisierapparat auf 100° erwärmt und zu beiden je 150 ccm Chloroformwasser zugesetzt. Die Gläser wurden dann zugemacht und in einen Thermostaten bei einer Temperatur von 60° gestellt.

Nach 24 Stunden wurde die Flüssigkeit abgegossen und abfiltriert. Die Zuckerbestimmung ergab darin folgende Resultate:

		I (erhitzt)	II (nicht erhitzt)
Zucker (Glucose)	In der zum Versuch benutzten Holzmenge	0,23 g	1,41 g
	Auf 100 g lufttrockenen Holzes	1,53 „	9,40 „

Die Jodreaktion zeigte noch das Vorhandensein größerer Stärkemengen auch im Holze der II. Portion nach. Deshalb fügte ich von neuem 100 ccm Chloroformwasser hinzu und stellte sie noch für weitere 24 Stunden in den Thermostaten.

In der abgegossenen Flüssigkeit wurden nur 0,11 g Zucker gefunden, was auf 100 g Holz 0,75 g ausmacht. Es wurde also keine weitere nennenswerte Lösung der Stärke nachgewiesen. Das im Holz enthaltene stärkelösende Enzym, welches seine Tätigkeit während der ersten 24 Stunden offenbarte, ist augenscheinlich unter dem Einfluß irgendwelcher Faktoren in einen unaktiven Zustand übergegangen. Wie aus den angeführten Zahlen zu ersehen ist, war der Zuckergehalt im nicht erhitzten Holz ungeachtet der unvollständigen Lösung der Stärke ein ziemlich hoher und erreichte mehr als 10% des Trockengewichts des Holzes.

Versuche mit Blättern von Ribes aureum.

Blätter von Ribes aureum, welche Mitte Mai ungefähr um 11 Uhr morgens genommen waren, wurden längs dem Mittelnerven in zwei Hälften geschnitten und aus den korrespondierenden Hälften zwei Portionen zusammengestellt. Diese Portionen wurden gewogen und in 2 Gläser gelegt, von denen das eine (I) auf 100° kurz erhitzt wurde. Zu beiden wurde dann je 150 ccm Chloroformwasser zugesetzt, die Gläser mit angeschliffenem Stöpsel verschlossen und in einen Thermostaten bei 58 bis 59° C gestellt.

In denselben Thermostaten wurde auch eine Portion von ganzen Blättern (III) in einem ebensolchen Glase mit angeschliffenem Stöpsel gestellt; dieses Glas enthielt nur etwas Wasser ohne Chloroform, um die Luft über den Blättern feucht zu erhalten. Nach 20stündigem Verweilen im Thermostaten werden die Glasstöpsel in den Gläsern durch Watte ersetzt und nachdem zur III. Portion 100 ccm Wasser zugesetzt waren, alle Gläser 10 bis 20 Minuten im Kochschen Sterilisierapparat erhitzt. Dann wurden die Flüssigkeiten abfiltriert und der Zucker darin bestimmt.

	I	II	III
Gewicht der Blätter . .	15,8 g	16,3 g	10,8 g
Zuckergehalt der Flüssigkeit	0,245 g	0,625 g	0,411 g
Zucker in 100 g Blätter .	1,55 „	3,83 „	3,81 „

Versuche mit Blättern von Populus nigra.

Die Mitte Mai um 4 Uhr nachmittags gesammelten Blätter wurden längs dem Hauptnerven zur Hälfte geschnitten und

mit den entsprechenden Hälften zwei Versuchsreihen mit zwei Versuchen in jeder Reihe angestellt, welche wir mit den Buchstaben a, b und α, β bezeichnen wollen. Alle Blätterproben wurden, wie auch in den Versuchen mit Ribes-Blättern, in Gläser gelegt. Die Temperatur im Thermostaten betrug 56 bis 58° C.

a) 19,5 g Blätter, im Sterilisierapparat auf 100° C erhitzt, + 150 ccm Chloroformwasser, im Thermostaten 16 Stunden;

b) 19,2 g Blätter + 150 ccm Chloroformwasser, im Thermostaten 16 Stunden;

α) 20,7 g Blätter + 150 ccm Wasser, im Sterilisierapparat erhitzt (Zucker bestimmt);

β) 20,7 g Blätter, im Thermostaten 16 Stunden (ohne Wasser und ohne Chloroform).

Um die Extraktion bei der Zuckerbestimmung zu erleichtern, wurden die Blätter in einem Mörser mit etwas Quarzsand zerrieben. Die erhaltene Masse wurde in Kolben übertragen, in welche auch das Wasser, in dem die Blätter im Thermostaten gelegen hatten, hineingegossen wurde. Dann wurde die Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen gebracht, die Kolben nach kurzem Erhitzen im Sterilisierapparat 24 Stunden stehen gelassen, die Flüssigkeit abfiltriert und der Zucker darin bestimmt.

	a)	b)	α)	β)
Zucker gefunden	0,183 g	0,498 g	0,204 g	0,471 g
Auf 100 g Blätter	0,94 „	2,60 „	0,99 „	2,28 „

In den Blättern, welche keinem vorläufigen Erhitzen unterworfen waren, konnte nach ihrem Aufenthalte im Thermostaten keine Stärke (weder makro- noch mikrochemisch) nachgewiesen werden.

In den frisch gesammelten und auch in denjenigen Blättern, welche vor dem Aufenthalt im Thermostaten einem Erwärmen im Sterilisator unterworfen waren, konnte die Stärke leicht durch die Sachssche Jodprobe nachgewiesen werden; sie war auch im wässerigen Auszug aus denselben nachweisbar.

In den Versuchen mit Blättern, ebenso wie in den früher beschriebenen Versuchen mit der Rinde, war die Lösung der Stärke eine so vollständige, daß diese Methode eines einfachen Aushaltens der betreffenden Objekte bei 60 bis 70° C offenbar

eine bequeme quantitative Bestimmung der Stärke in denselben ermöglichen dürfte. Hier kann die Lösung der Stärke und ihre Verwandlung in Zucker durch das schon im pflanzlichen Gewebe selbst enthaltene Enzym hervorgerufen werden.

Ob dabei eine vollständige Verzuckerung der Stärke bis zur Glucose erreicht wird, das ist eine Frage, deren Lösung ich bei meinen Versuchen nicht im Auge hatte. Übrigens könnte die Verzuckerung, wenn sie im oben angeführten Sinne eine unvollständige wäre (was sehr wahrscheinlich ist), durch Behandlung der aus der Stärke entstandenen löslichen Produkte mit Säure unschwer zu Ende geführt werden.

Die Intensität der diastatischen Einwirkung der Rinde auf Stärkekleister.

Oben wurde schon erwähnt, daß die zerkleinerte Rinde sowohl in frischem, als auch in trockenem Zustande eine energische, auflösende und verzuckernde Wirkung auf Stärkekleister ausübt.

In den unten angeführten Versuchen sollte die relative Intensität der diastatischen Einwirkung der Rinde im Vergleich zu dem gewöhnlich in der Technik angewandten Malz festgestellt werden.

Für diese Versuche wurde Rinde gebraucht, welche jungen, 3 bis 5jährigen Zweigen während der Frühlingsperiode der Stärkeauflösung entnommen war. Sowohl Malz, als auch Rinde wurden in getrocknetem und zerriebenen Zustande benutzt.

Alle Versuche wurden als Parallelversuche in gleichen Bedingungen ausgeführt. Für jeden wurde aus 5 g Kartoffelstärke und 70 g Wasser zubereiteter Stärkekleister benutzt. Zu jeder Portion dieses Kleisters, dessen Temperatur auf dem Wasserbade auf 60° C gehalten wurde, wurde eine bestimmte Menge Malz oder Rinde (nach vorläufigem Anfeuchten mit Wasser) zugefügt; die Menge des mit dem Malz und der Rinde eingeführten Wassers war so bemessen, daß seine Gesamtmenge mit der im Kleister enthaltenen 100 ccm ausmachte.

Es wurde genommen:

Malz	2 g	bei 60° C.
Rinde von Robinia Pseudacacia	5 „	
Rinde von Populus nigra . . .	5 „	

Jede halbe Stunde wurden kleine Proben der Flüssigkeit genommen und die Jodreaktion ausgeführt.

	Jodreaktion:
Mit Malz	nach $^1/_2$ Stunde rote Färbung, „ 1 „ keine „
Mit Rinde von Robinia Pseudacacia . . .	nach $^1/_2$ Stunde blauviolette Färbung, „ 1 „ violette „ „ 2 „ rote „ „ 4 „ keine „
Mit Rinde von Populus nigra	nach 10 Stunden wird noch eine blaue Färbung erhalten.

Beim Versuche mit Robinia-Rinde, ebenso wie beim Versuche mit Malz, trat äußerst rasch eine Verflüssigung des Stärkekleisters ein. Schon nach 10 Minuten verwandelte sich der dicke, opaleszierende Kleister in eine vollkommen klare, leicht bewegliche Flüssigkeit. Nach 4 Stunden zeigte die Flüssigkeit (beim Versuche mit Robiniarinde) eine starke reduzierende Wirkung auf Fehlingsche Lösung.

Ein später angestellter Versuch mit der Rinde von Caragana arborescens (welche zur selben Periode genommen wurde), zeigte, daß ihre amylolytischen Eigenschaften diejenigen der Robiniarinde noch übertreffen. Bei denselben Bedingungen, wie in den oben beschriebenen Versuchen mit letzterer, verschwand die Jodreaktion auf Stärke und Dextrin schon nach 2 Stunden. In einem anderen Versuch, in welchem statt 5 nur 3 g Rinde genommen worden war, wurde das Verschwinden der Jodreaktion auf Stärke und Dextrin nach 4 Stunden beobachtet.

Eine sehr starke Wirkung auf Stärkekleister zeigte auch der wässerige Auszug aus Caraganarinde. Zu 100 ccm eines 2%igen Stärkekleisters wurden 20 ccm eines wässerigen Auszugs aus 3 g Rinde hinzugefügt und die Mischung bei 60° C gehalten. Schon nach 5 Minuten war der Stärkekleister verflüssigt, nach $^1/_2$ Stunde verschwand die Reaktion auf Stärke, und nach $1^1/_2$ bis 2 Stunden auch diejenige auf Dextrin.

Zu allen oben beschriebenen Versuchen übte die Flüssigkeit, nachdem die Dextrinreaktion verschwunden war, eine stark reduzierende Wirkung auf die Fehlingsche Lösung aus.

Aus den angeführten Versuchen ist zu ersehen, daß die Rinde der Robinia und besonders der Caragana arborescens in der Intensität ihrer amylolytischen Wirkungsweise auf Stärkekleister dem Malz nicht besonders nachstehen, und man kann annehmen, daß sie nötigenfalls mit Erfolg zur Verzuckerung der Stärke in einigen technischen Verfahren, in denen dieser Prozeß stattfindet, benutzt werden könnten.

Zur Frage über die Teilnahme der „lebenden" Plastide an der Umwandlung der Stärke.

Was die Rolle der „lebenden" Plastiden bei der Umwandlung der Stärke betrifft, so schreibt man dem Stroma der Plastiden gewöhnlich eine aktive Beteiligung sowohl der Abscheidung, als auch bei der Auflösung der Stärke zu, wenigstens in den ersten Stadien.[1]) Die oben angeführten Beobachtungen über die Auflösung der Stärke in den Zellen bei einer Temperatur über 60° deuten auf die Möglichkeit einer solchen Auflösung auch in den Anfangsstadien ohne aktive Beteiligung des „lebenden" Plastiden. Aber wenn die Plastiden in diesem Prozesse auch nicht als aktive Lösungsfaktoren mitwirken, so ist dennoch kein Grund dazu vorhanden, ihnen nicht nur bei der Abscheidung, sondern auch bei der Lösung der Stärke eine wesentliche Rolle abzusprechen.

Die wichtige Rolle der Plastiden bei der Stärkebildung kann natürlich keinem Zweifel unterliegen; sie ergibt sich deutlich schon aus den morphologischen Tatsachen, welche das Verhältnis der Stärkekörner zu den Plastiden bestimmen.[2]) Es entsteht die Frage, worin diese Rolle bestehen mag.

Früher wurde diese Frage in dem Sinne entschieden, daß die Eiweißstoffe der Plastiden, indem sie eine Umwandlung erfahren, das Material für die Stärkebildung liefern. Nachdem für einige hydrolysierende Fermente die Fähigkeit, eine umgekehrte, zur Synthese des ursprünglich von demselben Fermente gespalteten Körpers führende Reaktion (wie man anfangs

---

[1]) S. Brown and Morris, Contribution to the chemistry and physiology of foliage leaves: Journ. of the Chem. Soc. **63**, 604, 1893.

[2]) Art. Meyer, Unters. über die Stärkekörner, 1895.

nach dem Erscheinen der Arbeit von Hill dachte[1]) einzuleiten, nachgewiesen worden war, entstand natürlicherweise die Annahme von der Beteiligung der stärkelösenden Amylase an der Synthese der Stärke.

Gegenwärtig ist für viele Fälle die Anwesenheit von Amylase in stärkespeichernden Zellen festgestellt.[2])

In einer und derselben Zelle wechseln die Vorgänge der Abscheidung und Auflösung der Stärke periodisch ab, je nachdem, wie die Bedingungen der Zufuhr des stärkeliefernden Materials sich gestalten.[3])

Dieselbe Erscheinung zeigten auch die Rindenzellen. In der Rinde, welche im Frühjahr in der Periode energischer Stärkelösung während der Knospenentfaltung untersucht wurde und, wie die Versuche mit Stärkekleister zeigen, reich an Amylase war, konnte von neuem eine reichliche Stärkeablagerung beim Übertragen in eine Zuckerlösung hervorgerufen werden.

Zu diesen Versuchen wurde die Rinde von Sophora und Robinia genommen, welche Mitte Mai von 5- bis 7jährigen Zweigen zur Zeit ihrer Laubentfaltung abgelöst worden war. Zu dieser Zeit war die Rinde beinahe ganz frei von Stärke. Rindenstreifen von 4 bis 5 cm Länge wurden in eine Glucose- und Saccharoselösung von verschiedenen Konzentrationen (nämlich von 20, 10, 5 und $2^1/_2$ %) so gelegt, daß sie bis zur Hälfte ihrer Länge in die Flüssigkeit eintauchten. Einige Rindenstreifen wurden auf dieselbe Weise in Wasser gelegt. Der Versuch wurde bei gewöhnlicher Temperatur (20°) ausgeführt. Nach 2 Tagen wurden alle Rindenstreifen auf ihren Stärkegehalt untersucht. Dabei

---

[1]) C. Hill, Reversible zymohydrolysis. Journ. of the chem. Soc. **78**, 634, 1898.

[2]) E. Eisenberg (Beiträge zur Kenntnis der Entstehungsbedingungen diastatischer Enzyme in höheren Pflanzen, Flora 97, 347, 1907) kommt auf Grund ihrer Untersuchungen über den Diastasegehalt in Blättern (in Übereinstimmung mit früheren Angaben von Brown und Morris [l. c.]) zu dem Schluß, daß „im allgemeinen Blätter, die bei der Assimilation leicht Stärke speichern, viel Diastase enthalten, während Zuckerblätter arm an dem Enzym sind". Dieselbe Verf. hat auch gezeigt, daß beleuchtete Blätter während der Periode energischer Stärkespeicherung reicher an Diastase, als entstärkte beschattete Blätter derselben Pflanze sind. Die gegenteiligen Angaben Brown und Morris über ein relatives Sinken des Diastasegehaltes beim Tageslichte konnten in keinem Falle bestätigt werden.

[3]) Vgl. B. Jost, Vorlesungen über Pflanzenphysiologie, 1908, 127, 192.

wurden die aus der Flüssigkeit genommenen Streifen der Länge nach durch Radialschnitte gespaltet, dann für einige Zeit in kochendes Wasser, nachher in eine schwache Jodkaliumlösung gelegt.

Die Stellen, an welchen eine Stärkespeicherung stattgefunden hatte, waren durch eine auf der frischen Schnittfläche deutlich hervortretenden Blaufärbung kenntlich. Daneben wurde die Rinde auch mikroskopisch untersucht. In der auf 10 bis 20 $^0/_0$-Glucose- und Saccharoselösungen gehaltenen Rinde konnte eine reichliche Stärkeabscheidung[1]) konstatiert werden; etwas schwächer war dieselbe auf 5 $^0/_0$-Lösungen und ziemlich schwach, besonders bei Robinia (die Stärke befand sich nur in der innersten, dem Holze zugekehrten Teile der Rinde), auf $2^1/_2$ $^0/_0$; die auf Wasser gehaltene Rinde enthielt überhaupt keine Stärke.

Es konnte also durch eine Erhöhung der Zuckenkonzentration eine sofortige Stärkeablagerung in den Zellen hervorgerufen werden, in welchen vor dem Versuche eine energische Auflösung derselben beobachtet wurde. Aus den angeführten Tatsachen ist zu ersehen, daß die im Frühling stattfindende Auflösung und Entfernung der Stärke aus der Baumrinde durch eine Abnahme des Zuckergehalts bedingt ist, welche durch den Zuckerverbrauch von seiten des sich entfaltenden Laubes hervorgebracht wird.

Die Vorgänge der Bildung und Lösung der Stärke weisen Verhältnisse auf, welche für ein stationäres Gleichgewicht reversibler Reaktionen charakteristisch sind. Indessen bleibt die Frage, ob die Erscheinungen der Stärkelösung und -speicherung in der Pflanze in der Tat nur Phasen ein und derselben umkehrbaren Reaktion seien, vorderhand noch offen. Es sei hier nur darauf hingewiesen, daß durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration die Lösung der Stärke in den Zellen auch dann aufgehalten wird, wenn die Möglichkeit einer Speicherung durch die Einwirkung von Chloroform ausgeschlossen ist.

Folgender Versuch wurde von mir ausgeführt.

Rinde von Sophora japonica, welche Mitte März entnommen war und viel Stärke enthielt, wurde in Stücke geschnitten und davon 4 Portionen entnommen: 2 zu 15 g (A und B) und 2 zu 5 g (C und D). Zu den Portionen A, B und C wurden je 50 g Chloroformwasser zugesetzt; zu A und C unmittelbar, zu B nach vorläufigem kurzen Erwärmen auf 100° im Sterilisator. Zu D wurde statt Chloroformwasser 50 ccm einer mit Chloroform gesättigten 10 $^0/_0$igen Glucoselösung hinzu-

[1]) Besonders in dem Mittelteile des Streifens, welcher sich über der Flüssigkeitsoberfläche befand.

gefügt. Dann wurden alle Portionen in den Thermostaten bei 40° gestellt.

Nach 2 Tagen wurde die Rinde sämtlicher Proben auf ihren Stärkegehalt mikroskopisch untersucht und die Flüssigkeit der Portionen A, B und C mit Fehlingscher Lösung auf ihren Zuckergehalt geprüft.

A. In der Rinde fehlt Stärke beinahe vollständig; nur stellenweise in geringen Mengen vorhanden. Die Flüssigkeit reduziert stark die Fehlingsche Lösung. 10 ccm der letzteren werden durch 2 ccm der Flüssigkeit vollkommen reduziert.

B. Viel Stärke, wie auch früher. Die Flüssigkeit reduziert die Fehlingsche Lösung schwach. 10 ccm Fehlingscher Lösung geben mit 2 ccm Flüssigkeit einen unbedeutenden Niederschlag von Cu_2O, die Lösung bleibt intensiv blau.

C. Keine Stärke vorhanden, starke (vollständige) Reduktion der Fehlingschen Lösung.

D. Viel Stärke; beinahe ebensoviel wie früher.

Nach weiteren 2 Tagen im Thermostaten bei derselben Temperatur.

A. Keine Stärke (mit Ausnahme einiger peripherischer Zellen).

D. Viel Stärke; im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung nur wenig vermindert.

Der Einfluß der Glucose, welcher sich in einer starken Verminderung der Stärkeabnahme in der Rinde äußerte, kann im vorliegenden Falle nicht durch eine die Lösung der Stärke kompensierende Speicherung derselben erklärt werden, da die Gegenwart des Chloroforms, wie aus den vorhergehenden Versuchen ersichtlich ist, die Möglichkeit einer Speicherung ausschließt. Die Glucose verhindert augenscheinlich direkt den Lösungsvorgang.

Die Annahme einer Mitwirkung der Amylase bei der Synthese der Stärke aus Zucker ist auf den ersten Blick schlecht vereinbar mit der Tatsache, daß die Abscheidung der Stärke auf Kosten des Zuckers in Gegenwart von Toluol und Chloroform nicht vor sich geht, obgleich in den Zellen aktive Amylase vorhanden ist. Das kann aber auf eine Störung in der Funktion der Plastiden zurückgeführt werden, welche zweifellos einen gewissen Einfluß auf diesen Vorgang ausüben. Diese Veränderungen in der Funktionsweise der Plastiden erklären uns wahrscheinlich auch die Erscheinungen der komplizierten Abhängigkeit der Lösung und Abscheidung der Stärke von der Temperatur.

Die Bedeutung der Plastiden besteht vielleicht darin, daß sie als Kondensatoren des zur Stärkebildung dienenden Materials

funktionieren in dem Sinne, wie Hofmeister[1]) die Rolle der protoplasmatischen Gebilde bei der Verteilung der gelösten Stoffe in der Zelle auffaßt. Den Gedanken über eine derartige Einwirkung der plasmatischen Bestandteile auf den Gang der chemischen Umwandlungen in der lebenden Zelle entwickelt in seiner Arbeit „Über Regulation der Stoffaufnahme" Nathansohn[2]).

Durch eine Veränderung der Eigenschaften, welche die Beziehung des Protoplasmas zum Zucker bestimmen, hat Czapek[3]) schon 1901 den Einfluß der niedrigen Temperaturen auf die Lösung der Stärke zu erklären versucht: „Ungezwungen läßt sich" — sagt er — „die winterliche Stärkelösung und Erhöhung der Zuckerkonzentrationsschwelle für die Stärkebildung durch die Annahme verstehen, daß infolge der Temperaturerniedrigung im Cytoplasma ein Anziehungszentrum für Zucker in höherem Grade als sonst geschaffen wird, daß also der Einfluß der Temperaturerniedrigung auf einer vermehrten Zuckerspeicherung des Zellplasmas außerhalb der Amyloplasten beruht." Nach Czapek wäre die Erklärung für den Einfluß der niederen Temperaturen auf die Lösung und Speicherung der Stärke in ihrer Einwirkung auf das Plasma und nicht auf die Amyloplasten zu suchen. Dabei schließt er die Möglichkeit nicht aus, „daß wenigstens partiell eine lockere Bindung des Zuckers etwa in Glykosidform an verschiedenen Plasmasubstanzen eintritt".

In der von Czapek vorgeschlagenen Erklärung bleibt nur der Grund nicht ganz klar, welcher den Verfasser veranlaßt, die von ihm diskutierte Erscheinung ausschließlich auf Veränderungen der Protoplasmaeigenschaften zurückzuführen. Die Verschiebung des Kondensationszentrums des Zuckers aus der Plastide in das Protoplasma und umgekehrt kann in gleichem Maße durch Veränderungen sowohl im Protoplasma als auch in der Plastide bedingt sein.

---

[1]) Hofmeister, Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 28, 210, 1891.

[2]) A. Nathansohn, Über Regulationserscheinungen im Stoffaustausch. Jahrb. f. wiss. Bot. 38, 241, 1903, und 40, 403, 1904.

[3]) F. Czapek, Der Kohlenhydratstoffwechsel im Winter. Ber. d Deutsch. bot. Ges. 19, 120, 1901.

Wo aber auch die Veränderungen, welche die Verteilung des Zuckers in der Zelle bestimmen, vorgehen sollten, jedenfalls unterliegt es keinem Zweifel, daß diese Veränderungen die Stärkespeicherung beeinflussen müssen.

Wenn wir die Möglichkeit einer solchen Neuverteilung des Zuckers in Verbindung mit einer Veränderung der Eigenschaften der plasmatischen Gebilde der Zelle annehmen, so können wir darin eine teilweise Erklärung auch für die oben beschriebenen Erscheinungen suchen, welche einerseits durch die Einwirkung von Toluol und Chloroform, andererseits durch hohe Temperaturen hervorgerufen werden.

Oben wurde schon darauf hingewiesen, daß die Vorstellung von einer Beteiligung des amylolytischen Enzyms in der Stärkesynthese zurzeit noch nicht als genügend begründet bezeichnet werden kann. Freilich verfügen wir jetzt schon über einige Angaben von einer enzymatischen Synthese der Stärke aus ihren Spaltungsprodukten[1]), aber die chemische Seite dieser Vorgänge ist noch nicht genügend aufgeklärt und die Beteiligung des amylolytischen Enzyms in diesen Prozessen noch nicht hinreichend bewiesen.

Was die anderen hydrolysierenden Enzyme anbetrifft, so zeigt die nähere Untersuchung der von ihnen verursachten synthetischen Reaktionen, daß diese Synthese nicht zum ursprünglichen vom Enzym gespalteten Körper führt[2]), und Armstrong[3]) kommt zu dem allgemeinen Schluß, daß „Enzyme gerade diejenigen Moleküle aufbauen, welche sie nicht zu spalten vermögen".

[1]) J. Wolff et A. Fernbach, Sur la coagulation de l'amidon. Compt. rend. de l'acad. des sciences. Paris. 137, 718, 1903. — L. Maquenne, Sur la rétrogradation de l'empois d'amidon. Ibid. 797 — L. Maquenne, A. Fernbach et J. Wolff, Rétrogradation et coagulation de l'amidon. Ibid. 138, 49, 1904. — A. Fernbach et J. Wolff, Nouvelles observations sur la formation diastasique de l'amylocellulose. Ibid. 819. — A. Fernbach et J. Wolff, Sur la coagulation diastatique de l'amidon. Ibid. 139, 1217, 1904. — S. auch Cremer, Über Glykogenbildung im Hefepreßsaft. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 2062, 1899.

[2]) Vgl. H. Euler, Gleichgewicht und Endzustand bei Enzymreaktionen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 146, 1907. — Idem., Allgemeine Chemie der Enzyme. Ergebnisse der Physiologie, 6, 1. u. 2. Abt. 187, 237, 1907.

[3]) Armstrong, Proc. of the Roy. Soc., Ser. B, 76, 592, 1905.

Euler[1]) neigt ebenfalls zu der Annahme von der Existenz ausschließlich spaltender und ausschließlich synthesierender Enzymmoleküle.

Bei einer solchen Sachlage versteht es sich von selbst, daß, ehe wir die umkehrbaren Enzymreaktionen zur Erklärung der synthetischen Prozesse in der lebenden Zelle heranziehen, zuerst noch weitere Untersuchungen über diese Fähigkeit der Enzyme zu reversiblen Reaktionen notwendig sind.

Zusammenfassung der Resultate.

Unter der Einwirkung von Toluol und Chloroform kann die in der Rinde und auch im Holze gespeicherte Stärke gelöst werden. Diese Auflösung kann nicht nur durch eine Erhöhung der Atmungsintensität erklärt werden, da sie von einer Zuckeranhäufung begleitet wird. In dieser Beziehung zeigt die Wirkung des Toluols und Chloroforms eine gewisse Analogie mit der Einwirkung niederer Temperaturen. In beiden Fällen wird die Verwandlung der Stärke in Zucker wahrscheinlich durch eine Abschwächung der synthetischen (im Sinne einer Stärkebildung) Tätigkeit der Plastiden bedingt.

Eine ähnliche Erscheinung der Stärkelösung mit Zuckeranhäufung kann auch durch ein Erhöhen der Temperatur über eine gewisse Grenze hervorgerufen werden. Versuche bei verschiedenen Temperaturen haben gezeigt, daß die Lösung der Stärke und die Bildung reduzierender Zuckerarten in der Rinde sehr rasch bei 60 bis 70° vor sich gehen. In der Rinde von Sophora, welche reichliche Stärkevorräte enthält, verschwand letztere nach einigen Stunden. Bei 80° verschwindet die Stärke ebenfalls rasch, aber es entstehen dabei neben einer geringen Menge Fehlingsche Lösung reduzierender Produkte hauptsächlich dextrinartige Stoffe, welche mit Jod eine violettrote Färbung geben.

Die durch die angeführten Angaben begründete Annahme von der Gegenwart eines stärkeverzuckernden diastatischen Enzyms in der Rinde ist durch weitere Untersuchungen an der Rinde verschiedener Bäume bestätigt worden. Sowohl getrocknete und zerriebene Rinde, als auch wässerige Auszüge aus der-

[1]) Euler, l. c.

selben riefen bei 50° eine rasche Verflüssigung des Stärkekleisters hervor, wobei nach einiger Zeit die Stärkereaktion verschwindet und die Flüssigkeit die Fähigkeit, Fehlingsche Lösung zu reduzieren, gewinnt.

Durch Fällen mit Alkohol aus einem wässerigen Auszuge wurde ein sehr aktives Präparat des diastatischen Enzyms erhalten.

Die Rinde selbst und der wässerige Auszug aus derselben hatten die Fähigkeit, Maltose zu invertieren. Das mit Alkohol gefällte Präparat besaß diese Fähigkeit nicht.

Die Beobachtung der Auflösung der in den Pflanzengeweben enthaltenen Stärke bei 50 bis 60° gibt uns eine bequeme Methode zum Auffinden des diastatischen Enzyms.

Bei der Anwendung dieser Methode auf Blätter wurde eine vollständige Auflösung der darin enthaltenen Stärke innerhalb einiger Stunden konstatiert.

Die Auflösung der Stärke in den oben beschriebenen Versuchen mit Rinde und Blättern war eine so vollkommene, daß diese Methode zu einer quantitativen Stärkebestimmung benutzt werden könnte.

Die Prüfung von frischem und trockenem Holz nach derselben Methode ergab auch hier die Anwesenheit eines stärkeverzuckernden Enzyms. Die Auflösung der Stärke im Holz ging nicht zu Ende, was durch einen Übergang des Enzyms in einen unaktiven Zustand erklärt werden könnte, aber die Quantität des gebildeten Zuckers erreichte bei einem Versuche mit Sophoraholz 10% der zum Versuch verwandten Holzmasse.

Die angegebene Methode der Entdeckung eines diastatischen Enzyms gewährt außer ihrer Einfachheit im Vergleich zu derjenigen von Brown und Morris noch den Vorzug, daß sie die Anwesenheit dieses Enzyms auch dort anzeigt, wo die Brown- und Morrissche Methode im Stich läßt (z. B. in der Rinde von Populus nigra).

Nach der Intensität ihrer diastatischen Wirksamkeit auf Stärke steht die Rinde einiger Papilionaceen dem Malz nur wenig nach und könnte nötigenfalls in einigen auf Stärkeverzuckerung begründeten technischen Verfahren Verwendung finden.

In der an Diastase reichen, während der Frühlingsperiode

der Stärkeauflösung genommenen Rinde, kann bei Einlegen in eine Zuckerlösung von neuem eine reichliche Stärkespeicherung erzielt werden.

Die Zuckerlösung verhindert die Auflösung der Stärke in den Rindenzellen auch dann, wenn die Möglichkeit einer Stärkeabscheidung durch Einführung von Chloroform ausgeschlossen ist.

Zur Entscheidung der Frage über die Mitwirkung des amylolytischen Enzyms an der Stärkebildung sind weitere Untersuchungen notwendig.

Zur Kenntnis der komplexen Hämolysine.

Von

H. Tsurusaki.

(Aus der Bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 9. April 1908.)

I. Über die hemmende Wirkung des Harnstoffs und einiger verwandter Verbindungen.

Wir möchten im folgenden zunächst über einige Beobachtungen berichten, die sich auf die Hemmung der komplexen Hämolysine beziehen und die wohl aus zwei Gründen einige Beachtung verdienen. Die Versuche wurden vor allem in der Absicht unternommen, festzustellen, wie sich — gegenüber der bekannten Hemmungswirkung der Salze — Substanzen verhalten, welche, wie Harnstoff, die Wand der roten Blutkörperchen leicht durchdringen; ein gewisses Interesse haben sie aber wohl auch in der Richtung, daß der Harnstoff eines der einfachen Produkte des Stoffwechsels darstellt. Es sollen in Zukunft die Untersuchungen auf eine größere Anzahl von Substanzen, welche sich chemisch an die untersuchten anschließen, ausgedehnt werden. Wir gehen gleich zu der Schilderung unserer Versuche über.

30 g Harnstoff wurden in 100 ccm 0,85%iger Kochsalzlösung gelöst, so daß eine neutral reagierende Lösung resultierte, die ca. 5 Mol Harnstoff im Liter enthielt. In sämtlichen Versuchen wurde je 1 ccm einer 5%igen Aufschwemmung von zweimal gewaschenen Ziegenblutkörperchen in 0,85%iger Kochsalzlösung angewandt. Das Gesamtvolumen in den einzelnen Reagensgläschen wurde mit 0,85%iger Kochsalzlösung aus-

geglichen und betrug 2,2 ccm. Die zu untersuchende Substanz wurde zuerst zugesetzt, hierauf Amboceptor, Komplement und Blut. Die Versuchsreihen blieben 2 Stunden im Brutschrank bei 37° und über Nacht im Eisschrank.

Wir geben zunächst einen Versuch zur Bestimmung der hemmenden Wirkung des Harnstoffs wieder. Zu den unten angeführten wechselnden Harnstoffmengen wird zugesetzt in I 0,1 $^1/_{10}$ Amboceptor (vom Kaninchen, ca. 4 Amboceptoreinheiten) und 0,1 frisches Meerschweinchenserum, in II dieselbe Amboceptormenge und 0,1 inaktives ($^1/_2{}^h$ 55°) Meerschweinchenserum, in III nur 0,2 Kochsalzlösung. Das Resultat des Versuches gibt die folgende Tabelle:

Menge der Harnstofflösung	I	II	III
1,0	sehr wenig	sehr wenig-Spur	sehr wenig-Spur
0,8	Spur	Spürchen	Spürchen
0,6	Spürchen	minimal	minimal
0,5	Spur	minimal	minimal
0,4	mäßig-wenig	0	0
0,3	stark	0	0
0,2	fast komplett	0	0
0,1	komplett	0	0
0	komplett	0	0

Die Reihen II und III bilden, wie leicht ersichtlich eine notwendige Ergänzung zu dem in I enthaltenen Hauptversuch, indem sie die hämolytische Wirkung der Harnstofflösung für sich und in Gegenwart entsprechender unwirksamer Serummengen darstellen. Sie zeigen zugleich, daß die geringe hämolytische Wirkung der Harnstofflösung durch die Gegenwart von Serum keine Beeinflussung erleidet. So gering dieselbe ist, beeinflußt sie doch offenbar das Versuchsresultat und zeigt, daß bei Harnstoffmengen, die mehr als 0,6 ccm betragen, die hemmende Wirkung beginnt durch die vom Harnstoff selbst hervorgebrachte Hämolyse verwischt zu werden. Bei 0,6 der Harnstofflösung tritt die Hemmung der spezifischen Hämolyse am klarsten zutage, also bei einem Gehalt der Gesamtlösung an Harnstoff von ungefähr $1^1/_4$ normal.

Eine Aufhebung der hemmenden Wirkung der Harnstoff-

lösung kann auch durch sehr erhebliche Steigerung der Amboceptormenge nicht erzielt werden; selbst noch bei Anwendung von 160 Amboceptoreinheiten = 0,4 ccm des inaktiven Serums tritt nur eine minimale Hämolyse ein. Komplementvermehrung, der ja weit engere Grenzen gesetzt sind, hat einen geringen Einfluß auf die Hemmung, wie folgender Versuch zeigt.

In I je 0,6 ccm der Harnstofflösung, II Kontrolle mit Kochsalzlösung. Überall 4 Amboceptoreinheiten und wechselnde Mengen Meerschweinchenserum.

Meerschweinchenserum	I	II
0,4	wenig	komplett
0,2	Spur	„
0,1	Spur	„
0,05	„	fast komplett
0,025	„	stark-mäßig
0,01	„	wenig

Die beiden Versuche lassen schon vermuten, daß es sich bei der hemmenden Wirkung um eine Beeinflussung des Komplements handelt. Da die Methodik der Hämolysinuntersuchung durch den bekannten Bindungsversuch eine exakte Entscheidung der Frage erlaubt, wurde derselbe ausgeführt.

0,6 ccm der Harnstofflösung und die oben angewandten 4 Amboceptoreinheiten wurden der Blutaufschwemmung zugefügt, nach halbstündigem Verweilen des Gemisches bei 37° wurde zentrifugiert, das Sediment mehrmals gewaschen, in Kochsalzlösung wieder aufgeschwemmt und endlich 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement zugefügt. Es trat komplette Hämolyse ein als Beweis, daß die Bindung des Amboceptors an die Erythrocyten nicht beeinflußt wird, daß die hemmende Wirkung der Harnstofflösung sich also nur auf das Komplement beziehen kann. Die Hämolyse durch Saponin wird durch Harnstoff etwas begünstigt.

Der Untersuchung des Schwefelharnstoffs schien sich zunächst eine Schwierigkeit in den Weg zu stellen, da derselbe bei der Vorprüfung schon an und für sich eine weit stärkere Hämolyse hervorbrachte, als der Harnstoff. Es gelangte stets eine Lösung zur Anwendung, die ca. 1,4 Mol im Liter enthielt. 1,0 ccm derselben löste noch komplett, 0,9 stark, während 0,8 nur mehr Spuren von Hämolyse erkennen ließ. Es erwies sich

aber dieses Verhalten als nicht störend, da im Gegensatz zu den beim Harnstoff beobachteten Verhältnissen die hämolytische Wirkung des Schwefelharnstoffs offenbar durch geringen Serumzusatz (gegeben durch das komplementhaltige Serum) gehemmt wird. Im folgenden Versuch wurden wie oben 4 Amboceptoreinheiten und 0,1 Meerschweinchenserum als Komplement angewandt.

Schwefelharnstofflösung	
1,0	Spur
0,9	Spürchen
0,8	sehr wenig
0,7	wenig
0,6	stark
0,5	fast komplett
0,3	komplett
0	komplett

Ein Vergleich des Versuches mit dem oben geschilderten Harnstoffversuch ergibt, daß die hemmende Wirkung des Schwefelharnstoffs eine erheblich größere ist, daß sie ungefähr das Doppelte von der des Harnstoffs beträgt.

Als weiterer Repräsentant der dem Harnstoff nahestehenden Verbindungen wurde der Carbaminsäureäthylester, das Urethan, untersucht.

Es zeigte sich eine starke hämolytische Wirkung dieser Verbindung, von der eine Lösung in physiologischer Kochsalzlösung angewandt wurde, die 2,5 Mol im Liter enthielt. Zugleich trat aber auch hier wieder eine hemmende Wirkung des Serums zutage, die es ermöglichte, die Einwirkung des Urethans auf ein komplexes Hämolysin zu prüfen. Der folgende Versuch veranschaulicht klar die hier vorliegenden Verhältnisse.

In I werden jedesmal 4 Amboceptoreinheiten und 0,1 Meerschweinchenserum als Komplement zugesetzt, in II nur das entsprechende Volum Kochsalzlösung.

Urethanlösung	I	II
0,7	komplett	komplett
0,6	komplett (Zone)	komplett
0,5	sehr wenig	komplett
0,4	stark	Spur

Urethanlösung	I	II
0,3	fast komplett	0
0,1	komplett	0
0	komplett	0

Bei 0,5 der Urethanlösung, die ohne Serumzusatz komplett löst, tritt also die hemmende Wirkung deutlich zutage. Dieselbe erscheint etwa doppelt so stark als die des Harnstoffs; wenig mehr als eine $^n/_2$-Lösung genügt zu einer sehr erheblichen Hemmung der spezifischen Hämolyse.

Die Hemmung der Urethanhämolyse durch Serum bietet ganz eigenartige Verhältnisse, die zwar die Versuchsanordnung erschweren, aber interessant genug sind, um hier kurz besonders besprochen zu werden. Übersteigt man nämlich die Menge von 0,5 der Urethanlösung nur um ein weniges, indem man 0,7 derselben anwendet, so hört die Hemmung der Urethanlösung durch Serum, die allein die Beobachtung des Einflusses auf die spezifische Hämolyse ermöglichte, vollständig auf. Selbst sehr große Serummengen sind dieser Dosis gegenüber nicht mehr imstande, auch nur irgendwelchen Einfluß auszuüben. Wir wollen von unseren zahlreichen Versuchen einen wiedergeben, der mit Pferdeserum angestellt ist und die Verhältnisse gut veranschaulicht. Er zeigt zugleich, daß auch längere Digestion der Urethanlösung mit dem Serum keinerlei Einfluß auf diese Verhältnisse hat, die noch einer weiteren, eingehenden Analyse bedürfen.

Einer Untersuchung des Guanidins stellte sich dessen stark basischer Charakter in den Weg, der schon an und für sich eine sehr starke Hämolyse bewirkte, ähnlich lagen die Verhältnisse bei Guanidincarbonat. Wir benutzten schließlich das Guanidinchlorhydrat, das eine sehr starke hemmende Wirkung ergab. Bei der üblichen Versuchsanordnung, die wir nicht zu wiederholen brauchen, hemmten 0,3 einer $^n/_1$-Lösung vollkommen, 0,2 noch stark die spezifische Hämolyse. Ein Bindungsversuch, wie wir ihn oben für den Harnstoff beschrieben haben, zeigte, daß es sich auch hier nicht um eine Behinderung der Amboceptorbindung, sondern gleichfalls um eine Hemmung der Komplementwirkung handelt.

Überall Ziegenblut 10% 2mal gewaschen, 0,5 ccm.

A = Kochsalzlösung, Urethanlösung, Pferdeserum und Blut unmittelbar nacheinander.

I = Überall 0,7 ccm Urethanlösung.

II = Überall 0,5 ccm Urethanlösung + 0,2 ccm Kochsalszlösung.

B = Kochsalzlösung, Urethanlösung und Pferdeserum geschüttelt und 2 Stunden bei 37°, dann Blut zugefügt.

I = Überall 0,7 ccm Urethanlösung.

II = Überall 0,5 ccm Urethanlösung + 0,2 ccm Kochsalzlösung.

Pferdeserum (inaktiviert)	A		B		
	I	II	I	II	
0,4	komplett	Spürchen	komplett	Spürchen	
0,2	„	„	„	„	
0,1	„	„	„	„	
0,05	„	„	„	„	
0,025	„	„	„	Spur	
0,01	„	Spur	„	stark—mäßig	
0,005	„	wenig	„	fast komplett	Zone
0,0025	„	stark—mäßig	„	komplett-fast komplett	Zone
0,001	„	fast komplett-stark (Zone)	„	komplett	Zone
0	„	komplett	„	„	Zone
00 (ohne Urethanlösung)	0	0	0	0	

Es muß allerdings betont werden, daß die hemmende Wirkung des Guanidins nicht ohne weiteres mit der des Harnstoffs, des Sulfoharnstoffs und des Urethans in eine Reihe gestellt werden darf; denn es handelt sich hier um ein Salz, dessen hemmende Eigenschaften auch auf dieser Eigenschaft beruhen können. Die Entscheidung dieser Frage kann erst eine weitere Ausdehnung derartiger Untersuchungen bringen.

Bisher haben unsere Versuche ergeben, daß einem der wichtigsten einfachen Endprodukte des Stoffwechsels (und einigen diesem verwandten Substanzen) die Eigenschaft zukommt, die spezifische Hämolyse zu hemmen, und zwar dadurch, daß es die Komplementwirkung beeinträchtigt, vielleicht mit dem Komplement selbst in Beziehungen tritt. Besonders auch für die Kenntnis der Beeinflussung der den hämolytischen durchaus analogen bactericiden Prozesse durch Produkte des normalen (und pathologischen) Stoffwechsels wird es von Interesse sein, die hier begonnenen Studien nach verschiedenen Richtungen hin weiter fortzusetzen.

II. Über das Verhalten der Komplemente bei der Dialyse und bei Einwirkung heterologer Sera.

Unsere Kenntnis vom Verhalten der Komplemente ist in der letzten Zeit gefördert wurden durch einige neue Tatsachen, die von Ferrata in einer unter Morgenroths Leitung ausgeführten Arbeit und von Sachs und Teruuchi beschrieben worden sind. Ferrata fand, daß bei der Dialyse komplementhaltigen Meerschweinchenserums das Komplement in zwei Bestandteile zerfällt, deren einer sich in dem Globulinniederschlag, deren anderer sich in der durch Abzentrifugieren des ersteren erhaltenen klaren Flüssigkeit findet. Jeder dieser Bestandteile für sich ist unwirksam, dagegen geben beide vereinigt wieder das wirksame Komplement. Dieser Zerfall des Komplements in salzfreier resp. salzarmer Lösung ist auch die Ursache, weshalb die komplexen Hämolysine bei Salzmangel unwirksam werden, eine Tatsache, die für die analogen Bakteriolysine schon früher Buchner beschrieben hat, ohne deren Ursache zu erkennen.

Im Anschluß an Ferratas Mitteilungen erfolgten Untersuchungen von Brand, unter Leitung von H. Sachs ausgeführt, welche das Grundphänomen vollauf bestätigten, zugleich aber sehr wichtige weitere Beobachtungen lieferten. Brand stellte fest, daß von den beiden Komponenten des Komplements nur die eine, nämlich diejenige, welche in das Sediment bei der Dialyse übergeht, mit den amboceptorbeladenen Blutkörperchen in direkte Beziehung tritt, von diesen gebunden wird. Der in der Flüssigkeit verbleibende Komplementanteil wird von den amboceptorbeladenen Blutkörperchen nicht aufgenommen, vereinigt sich aber mit der von den Blutkörperchen verankerten Komponente zum wirksamen Komplement. Es besteht also zwischen den beiden Komponenten des Komplementes selbst, wie Brand richtig hervorhebt, eine ganz ähnliche Beziehung wie zwischen Amboceptor und Komplement, ein Verhältnis, dem Brand treffenden Ausdruck gab, indem er den einen im Sediment befindlichen Anteil als „Zwischenstück", den anderen als „Endstück" bezeichnete. Brand stellte ferner fest, daß das „Mittelstück" in physiologischer Kochsalzlösung rasch die Fähigkeit verliert, sich mit dem

„Endstück" zum wirksamen Komplement zu vereinigen, daß dagegen diese Vereinigung noch stattfindet, wenn das „Mittelstück" vor dem Hinzufügen des Endstücks mit den Blutkörperchen in Berührung gekommen ist, welche die Fähigkeit besitzen, auch das veränderte „Mittelstück" zu binden. Brands Beobachtungen wurden von Hecker bestätigt und noch vielfach ergänzt.

In einem Punkte konnte Brand die Angaben von Ferrata nicht bestätigen. Nach Ferrata wird das im Abguß enthaltene „Endstück" bei halbstündigem Erwärmen auf 55° inaktiviert, während das Zwischenstück thermostabil erscheint und diesem Eingriff widersteht. Brand fand beide Komponenten in gleicher Weise thermolabil und zwar gleichgültig, ob das das Zwischenstück enthaltende Sediment in Wasser nur aufgeschwemmt oder wieder in Kochsalzlösung gelöst war. Brand stellt die Vermutung auf, daß Ferratas Resultat dadurch vorgetäuscht wurde, daß eine zu große Amboceptormenge angewandt wurde, in deren Gegenwart auch der Abguß allein (Endstück) Komplementwirkung ausübt. Wird bei einer derartigen Versuchsanordnung eine Kontrolle, welche mit dem nicht erwärmten Abguß allein angestellt wird, versäumt, so kann bei der Kombination von frischem Abguß und erwärmtem Sediment die Täuschung entstehen, daß die stattfindende Hämolyse auf der Kombination beider Komponenten beruht, während sie tatsächlich auf die Wirkung des Abgusses allein zurückzuführen ist. Wir konnten vor allem die Beobachtung von Brand bestätigen und dahin erweitern, daß gelegentlich auch bei Anwesenheit geringer Amboceptormengen, der von uns gewöhnlich angewandten vier Amboceptoreinheiten, der Abguß allein noch erhebliche Komplementwirkung entfaltet. Es ist uns aber nicht gelungen, diese Erscheinung häufiger zu produzieren, ebensowenig wie es gelungen ist, sie mit Sicherheit zu vermeiden, trotzdem wir in großer Ausdehnung das Verfahren der Dialyse durch Anwendung verschiedener Membranen (Fischblase, Schilfsäckchen, Kollodiumsäckchen) varriierten. Nur auf einen Befund in dieser Hinsicht möchten wir hinweisen, welcher für einen Einfluß der Temperatur auf das Resultat der Dialyse zu sprechen scheint, der noch weiterhin untersucht werden soll. Nach 48 stündiger

Dialyse von Meerschweinchenserum durch Schilfsäckchen fand sich in einem Versuch mit Eiswasser fast das gesamte Komplement im Abguß, während in einem Parallelversuch, in dem gegen fließendes Leitungswasser dialysiert wurde, die typische Trennung eingetreten war. Der Versuch war, wie gewöhnlich, mit Ziegenblutkörperchen und vier Einheiten eines vom Kaninchen stammenden Amboceptors ausgeführt.

Jedenfalls bot uns der differente Befund Brands und dessen Begründung Anlaß, die Prüfung der Thermoresistenz von Mittelstück und Endstück zu wiederholen, mit dem Resultat, daß auch wir jetzt bei entsprechender Versuchsanordnung beide Komponenten als thermolabil erkannten.

Bei Ausdehnung der Dialyseversuche auf andersartige Komplemente zeigten sich Verhältnisse, die von denen am Meerschweinchenkomplement beobachteten abwichen. In zahlreichen Versuchen, die mit Kaninchenserum ausgeführt wurden (Ziegenblut, Amboceptor vom Kaninchen), blieb die Komplementwirkung regelmäßig auf den Abguß beschränkt. Es ist also anzunehmen, daß das Verhalten der Komplemente verschiedener Sera kein gleichartiges ist.

Besondere Verhältnisse zeigten sich bei der Dialyse normaler hämolytischer Sera, als deren Repräsentanten wir Hundeserum und Ziegenserum wählten unter Benutzung von Meerschweinchenblutkörperchen. Die intensive hämolytische Wirkung, die den beiden Sera, besonders dem Hundeserum eigentümlich ist, war in zahlreichen Versuchen nach 24 stündiger Dialyse vollkommen bis auf die letzte Spur verschwunden, weder Abguß noch Sediment für sich, noch die Vereinigung beider in verschiedenen Verhältnissen hatten irgendwelche hämolytische Wirkung.

Der Schlüssel zum Verständnis dieses eigentümlichen Verhaltens war wohl gegeben durch die Beobachtungen, die Sachs und Teruuchi am Meerschweinchenkomplement beschrieben hatten. Diese Autoren konnten feststellen, daß im frischen Meerschweinchenserum ein Ferment enthalten ist, welches das eigene Komplement dieses Serums in kurzer Zeit bei 37° zerstört, aber nur dann, wenn durch Verdünnen mit Wasser die Salzkonzentration der Lösung erheblich vermindert ist. Da nun ganz entsprechende Bedingungen auch während der Dialyse

eintreten, so war hier an ein besonders rasch wirkendes komplementzerstörendes Ferment zu denken, dessen Aktion das Mißlingen eines Trennungsversuches hervorrufen mußte.

Durch Verdünnung des Serums — wir führten die Versuche zunächst beim Hundeserum aus — nach dem Verfahren von Sachs und Teruuchi läßt sich in der Tat leicht der Nachweis eines solchen komplementzerstörenden Fermentes bringen; wenn auch eine etwaige Einwirkung auf den Amboceptor nicht ausgeschlossen erscheint, so darf man jedenfalls nach allem bis jetzt Bekannten die Vorgänge auf eine Einwirkung auf das Komplement zurückführen. Wir lassen einige unserer Versuche folgen.

Hundeserum wird mit Aqua destillata verdünnt und zwar im Verhältnis 1:2, 1:5, 1:10, 1:20; als Kontrolle dient eine Verdünnung des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5. Die Verdünnungen bleiben zwei Stunden im Brutschrank bei 37°, hierauf werden die einzelnen Dosen in Reagensgläser abgefüllt, überall mit Wasser auf das Gesamtvolum von 1 ccm aufgefüllt und zur Ergänzung des Salzgehalts je 0,1 ccm einer 8,5%igen Kochsalzlösung (bei 2,0 ccm 0,2) zugefügt; die Kontrolle wird natürlich einfach mit Kochsalzlösung aufgefüllt. Zum Schluß wird je 1 ccm 5%iges Meerschweinchenblut zugefügt. Die folgende Tabelle zeigt den Ausgang eines derartigen Versuchs.

Mengen	Verdünnungen				Kontrolle 1/5 mit Kochsalzlösung
	1/2	1/5	1/10	1/20	
2,0	—	0	0	0	—
1,0	—	0	0	0	komplett
0,8	—	0	0	0	—
0.4	—	0	0	0	fast komplett
0,2	wenig	0	0	0	Spur
0,1	Spürchen	0	0	0	Spürchen

Es zeigt sich hier eine rapide Zerstörung der hämolytischen Wirkung des Hundeserums, die schon bei der Verdünnung 1:5 eine vollkommene ist und deren Intensität uns durchaus erlaubt, das Prinzip von Sachs und Teruuchi für die Erklärung des Hämolysenverlustes bei der Dialyse heranzuziehen. Bemerkens-

wert ist, daß wir dasselbe Resultat und zwar schon nach $1^1/_4$stündigem Verweilen des mit Wasser ($^1/_5$, $^1/_{10}$, $^1/_{20}$) verdünnten Hundeserums bei 37° erzielten, wenn wir das Serum vorher 15 Minuten auf 51° erwärmt hatten. Das komplementzerstörende Ferment des Hundeserums ist also entweder thermostabiler als das von Sachs und Teruuchi studierte Ferment des Meerschweinchenserums, oder aber es ist in so großer Menge vorhanden, daß eine partielle Zerstörung desselben für die Wirkung praktisch nicht in Frage kommt.

Die Versuche mit Ziegenserum — die wegen der von Anfang an geringeren hämolytischen Kraft desselben nicht in dem Maße bezeichnend sind wie die mit Hundeserum — fielen, auch bei vorgängigem Erwärmen auf 51°, ganz in demselben Sinne aus, so daß man wohl berechtigt ist, die Existenz des komplementzerstörenden Ferments im Serum als eine ziemlich allgemeine Erscheinung anzusehen.

Das Vorkommen offenbar starkwirkender komplementzerstörender Fermente in verschiedenen Sera veranlaßte uns, zu untersuchen, ob eine gegenseitige Einwirkung stattfindet oder ob die Fermente eines Serums für dessen Komplemente spezifisch seien. Die Versuche, die fortgesetzt werden sollen, haben bis jetzt ein sicheres Resultat nicht ergeben. Wir verwandten zunächst Sera, welche für die Kombination Ziegenblut — Amboceptor vom Kaninchen — kein Komplement enthalten, indem wir sie in salzarmer Lösung auf Meerschweinchenserum einwirken ließen, dessen eigenes Ferment durch Erwärmen auf 51° abgeschwächt war. Aber weder Pferdeserum noch Rinderserum zeigten eine komplementzerstörende Wirkung. Dagegen ließ Hundeserum, das sich wegen der oben beschriebenen raschen Zerstörung des eigenen Komplements gut eignet, eine geringe Einwirkung erkennen. Wir hoffen, bei Fortsetzung der Versuche zu klareren Resultaten zu gelangen.

Beeinflussung der Autolyse durch anorganische Kolloide.[1])

IV. Mitteilung:

Wirkung auf den Abbau der Nucleine.

Von

Privatdozenten Dr. **M. Ascoli** und cand. med. **G. Izar.**

(Aus dem Institute für spezielle Pathologie der K. Universität Pavia, Direktor: Prof. L. Devoto.)

(Eingegangen am 8. Mai 1908.)

Die in der I. Mitteilung (1) niedergelegten, eine Beschleunigung der Leberautolyse bei Zusatz elektrischer Metallkolloide ergebenden Resultate hatten uns veranlaßt den Einfluß derselben auf den Stoffwechsel näher zu untersuchen, (2), wobei sich eine ganz erhebliche Steigerung der N-Ausfuhr kundgab. Bei der näheren Analyse der N-Verteilung im Harne waren besonders die $\overline{U}$-Werte

[1]) In den letzten Heften dieser Zeitschrift erschien eine Arbeit von Pincussohn „Beeinflussung von Fermenten durch Kolloide", in welcher die Beeinflussung von Pepsin durch Kolloide eingehend untersucht wird und eine Mitteilung von Wohlgemuth „Untersuchungen über die Diastasen" in welchen unter anderem der Einfluß einzelner Kolloide auf die Wirkung der Diastase geprüft wird. Wir können die Angaben dieser Autoren auf Grund ähnlicher Versuche, die wir erst nach Abschluß der Autolysestudien zu veröffentlichen beabsichtigten, bestätigen und hinzufügen, daß auch das stabilisierte elektrische Ag-Kolloid die Pepsinverdauung nicht begünstigt, daß auch die Verdauung von Gelatine durch Trypsin, die Milchgerinnung durch Lab, die Fettspaltung durch Pankreassteapsin und Lipase (Grübler), (Versuch von Dr. Preti) und die diastatische Wirkung des Pankreatins und der Takadiastase, im Gegensatz zur Autolyse, durch kolloides Ag nicht angefacht werden. Hingegen wird merkwürdigerweise das diastatische Ferment der Leber und des Blutserums durch kleine Mengen Ag aktiviert, wie wir auf Grund zahlreicher Versuche schon jetzt angeben können und in einer nächsten Mitteilung ausführlich darlegen werden.

in ganz erheblichem Maße absolut und relativ erhöht, welcher Umstand auf eine dominierende Beteiligung der Nucleine bei der beobachteten Stoffwechselaktivierung hinzuweisen schien.

In der Hoffnung, in die Entstehung dieser elektiven Beeinflussung nähere Einsicht zu gewinnen, sind wir zu den Reagensglasversuchen zurückgekehrt und gingen von der Fragestellung aus, ob und welche Wirkung elektrisch und chemisch bereitete anorganische Hydrosole auf die fermentative Zersetzung der Nukleine in vitro entfalten.

Beim Abbau dieser Körper sind bekanntlich nach den schönen, an die grundlegenden Horbaczewskis anknüpfenden Untersuchungen von Wiener, Schittenhelm, Burian und anderen Autoren eine Reihe verschiedener Fermente tätig (Nuclease, Xanthinoxydase, desamidierendes, urikolytisches Ferment); es galt den Ablauf ihrer spezifischen Leistungen in Anwesenheit anorganischer Kolloide zu verfolgen. Um uns ein orientierendes Gesamturteil über das Verhalten der bei der $\overline{U}$-Bildung in Betracht kommenden Nuclease, desamidierendes Ferment und Xanthinoxydase zu bilden, prüften wir zunächst die $\overline{U}$-Bildung in Milz und Leberkolaturen mit und ohne Zusatz von Kolloiden.

Von solchen negativen Ladungen ziehen wir auf elektrischem Wege nach Bredig bereitetes Silber, von positiv geladenen Ferrihydroxyd und Arsentrisulfid heran. Ihre Bereitung erfolgte nach den in den früheren Mitteilungen (3) angegebenen Methoden; bezüglich der hinzuzusetzenden Mengen besaßen wir in den früheren Autolyseversuchen willkommene Hinweise, die sich auch als zutreffend herausstellten. Folgende Präparate wurden benutzt:

$$\text{Ag VI} \quad -\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = 0{,}021, \text{ wobei } t = 45' - T = 37^\circ$$

Ag-Gehalt = 0,0285 %

$$\text{Ag VII} \quad -\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = 0{,}0324$$

Ag-Gehalt = 0,0275 %

$$\text{Ag VII A} \quad -\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = 0{,}0293$$

Ag-Gehalt = 0,0269 %

$$\text{Ag IX} \quad -\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = 0{,}0256$$

Ag-Gehalt = 0,027 %

$$\text{Ag VIII} \quad -\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = 0{,}0289$$

Ag-Gehalt = 0,032 %

$$\text{Ag X} \quad -\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = 0{,}04342$$

$$\text{Ag XII} \quad -\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = 0{,}0345$$

Ag-Gehalt = 0,0315 %

$$\text{Ag XIV} \quad -\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = 0{,}0304$$

Ag-Gehalt = 0,0294 %

$$\text{Ag XV} \quad -\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = 0{,}0395$$

Ag-Gehalt = 0,0372 %

$Fe(OH)_3$ III (Handelspräparat, dialysiert) —
Eisengehalt = 1,630 % = 3,11444 % $Fe(OH)_3$
= 0,2941 Mol pro Liter,
Acidität = 0,4088 % HCl.

As_2S_3 III — stabilisier- = 1,288 % As_2S_3 = 0,05 Mol pro Liter.

Die Präparate wurden alle mit Ausnahme von Ag Nr. VII A, Nr. IX und $Fe(OH)_3$ mit dialysierter Gelatine (0,03%) stabilisiert. Den Einfluß der Stabilisierung der Kolloide auf ihre die Autolyse betreffende Wirkung werden wir in einer weiteren Mitteilung näher analysieren. Bezüglich des $Fe(OH)_3$ versicherten wir uns in den Protokollen mitgegebenen Kontrollversuchen, daß sein geringer Säuregehalt nicht in nennenswerter Weise in Betracht kommt.

Was die Einzelheiten der Versuche betrifft, folgten wir der von Wiener (4) und Burian (5) eingehend beschriebenen Technik. Die Organbreikolaturen wurden meistens mit destilliertem Wasser hergestellt, um den möglicherweise störenden Salzzusatz zu vermeiden; Fluornatrium durch Toluol (2%) ersetzt. Während der Versuchsdauer wurden die beschickten Kolben im auf 37° eingestellten Brutschrank auf einen mit dem Heißluftmotor verbundenen Rolltischchen andauernd geschüttelt. Die Ū-Be-

stimmung geschah nach Ludwig-Salkowski unter Berücksichtigung der von Wiener (4) angegebenen Kautelen; in den ersten Versuchen (Tabellen 2, 3, 4) wurde die Harnsäure nach stattgefundener Wägung nach Horbaczewski umgefällt und gereinigt und abermals gewogen; bei der vollständig befriedigenden Übereinstimmung der zwei Werte sahen wir später von dieser Kontrollbestimmung ab.

In den Tabellen 1 bis 7 sind die Protokolle der Versuche mit Milz- und Leberbrei angeführt.

Tabelle 1.

Menge des Milzbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	$\bar{U}$ mg
1000 g + 3,5 Liter destilliertes Wasser	500	—	—	100	9·2
	500	16	—	100	24,9
	500	16	Ag VII 5	95	42.0
	500	16	id. 25	75	58,0
	500	16	id. 50	50	89,8
	500	16	id. 100	—	101,0

Tabelle 2.

Menge des Milzbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	$\bar{U}$ mg
1000 g + 3 Liter destilliertes Wasser	550	—	—	50	20,2
	550	20	—	50	60,5
	550	20	Ag VII A 5	45	88,2
	550	20	id. 50	—	140,0
	550	20	Ag VII 5	45	98,5
	550	20	id. 50	—	164,0

Tabelle 3.

Menge des Milzbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	$\bar{U}$ mg
300 g + 500 ccm destilliertes Wasser	200	16	—	50	39,0
	200	16	Ag VII 50	—	104,5
	200	16	Ag VII A 50	—	91,5

Tabelle 4.

Menge des Milzbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Fe- resp. As_2S_3-Gehalt mg	Destilliertes Wasser ccm	$\bar{U}$ mg
700 g + 2 Liter destilliertes Wasser	400	20	—	—	25	80,0
	400	20	—	—	25[1])	79,7
	400	20	$Fe(OH)_3$ III 0,5	8,15	24,5	110,1
	400	20	id. 5	81,5	20	70,5
	400	20	As_2S_3 III 0,5	6,441	24,5	94,8
	400	20	id. 5	64,41	20	69,9

Tabelle 5.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	$\bar{U}$ mg
800 g + 3 Liter destilliertes Wasser	600	—	—	50	0,0 Murexidprobe negativ
	600	20	—	50	13,2
	600	20	Ag VIII 5	45	24,0
	600	20	id. 25	25	39,5
	600	20	id. 50	—	59,8

[1]) Mit 21,5 ccm $^N/_{100}$-HCl versetzt, entsprechend der Acidität von 5 ccm $Fe(OH)_3$.

Tabelle 6.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	$\bar{U}$ mg
1000 g + 3 Liter destilliertes Wasser	500	—	—	50	0,0 Murexidprobe negativ
	500	20	—	50	16,4
	500	20	Ag IX 5	45	21,0
	500	20	id. 50	—	47,2
	500	20	Ag VIII 5	45	23,6
	500	20	id. 50	—	55,4

Tabelle 7.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Fe- resp. As_2S_3-Gehalt mg	Destilliertes Wasser ccm	$\bar{U}$ mg
1000 g + 4 Liter destilliertes Wasser	500	20	—	—	25	68,3
	500	20	—	—	25[1])	66,2
	500	20	$Fe(OH)_3$ III 0,1	1,63	24,9	84,2
	500	20	id. 0,5	8,15	24,5	108,3
	500	20	id. 5	81,5	20,0	59,0
	500	20	As_2S_3 0,5	6,441	24,5	88,7
	500	20	id. 1,5	19,323	23,5	111,4
	500	20	id. 5,0	64,41	20,0	50,2

[1]) Mit 21,5 ccm $^N/_{100}$-HCl versetzt, entsprechend der Acidität von 5 ccm $Fe(OH)_3$.

Denselben entnehmen wir, daß die postmortale $\overline{U}$-Bildung von Milz- und Leberauszügen schon durch minimale Mengen ($1^1/_2$ mg pro 130 g Leber) von Silberkolloid eine deutliche Zunahme erfährt, die bei größerem Zusatze ein Mehrfaches der Kontrollversuche beträgt. Desgleichen beschleunigen kolloidales Ferrihydroxyd und Arsentrisulfid die $\overline{U}$-Bildung. Bei letzteren Hydrosolen begegnen wir derselben Erscheinung, die in den früheren Versuchen aufgefallen war, nämlich, daß größere Mengen den entgegengesetzten Effekt, Hemmung der $\overline{U}$-Bildung hervorrufen. Was die Beurteilung des in dieser Hinsicht abweichenden Verhaltens des Silberkolloids anbelangt, verweisen wir auf die bei derselben Gelegenheit ausgeführten Bemerkungen.

Daß die nachgewiesene Anfachung eine tatsächliche und nicht allein durch Hemmung der $\overline{U}$-Zerstörung vorgetäuschte ist, geht mit Bestimmtheit aus den Versuchen mit Milzbrei hervor, welchem (6) ja $\overline{U}$-zerstörendes Ferment fehlt. Bezüglich der Leberversuche ist daran zu erinnern, daß Leberbrei zwar Urikolyse zu leisten imstande ist, daß aber deren Grenzen ohne ständige Luftdurchleitung ziemlich beschränkte sind; für eine so ansehnliche Zunahme der $\overline{U}$-Werte, wie sie namentlich in den sofort zu erwähnenden Versuchen bei Kolloidzusatz zutage tritt, kann der Faktor Hemmung der Urikolyse keineswegs verantwortlich gemacht werden. (Daß derselbe aber in Betracht kommt und eine Rolle spielt, werden wir unten an der Hand geeigneter Versuche erörtern.)

Den bisher erzielten Resultaten nach war zu erwarten, daß die geprüften Kolloide, die bei der $\overline{U}$-Bildung mitwirkenden Enzyme auch im einzelnen aktivieren würden. In Tabelle 8 bis 10 sind einige diesbezügliche Versuche wiedergegeben, in denen unter im übrigen gleicher Anordnung die $\overline{U}$-Bildung bei Zusatz von nucleinsaurem Na, resp. Guanin, mit und ohne Kolloiden, bestimmt wnrde: der Ausfall der Versuche vervollständigt die Ergebnisse der früheren, indem er zeigt, daß auch die einzelnen Fermente eine gleichsinnige Förderung erfahren.

Tabelle 8.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\bar{U}$ mg
500 g +1500ccm destilliertes Wasser	200	12	—	137,5	12,5 ccm Na_2CO_3 $^n/_1$-Lösung	20,9
	200	12	—	100	circa 250 mg Guanin in 12,5 ccm Na_2CO_3 $^n/_1$-Lösg. gelöst, auf 50 ccm aufgefüllt — entsprechend 277 mg $\bar{U}$	103,9
	200	12	Ag X 5	95		200,9
	200	12	id. 25	75		252,9
	200	12	id. 50	50		285,9
	200	12	id. 100	—		328,9

Tabelle 9.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\bar{U}$ mg
1000 g +2500ccm destilliertes Wasser	400	12	—	138	12 ccm Na_2CO_3 $n/_1$Lösung	38,9
	400	12	—	50	circa 200 mg Guanin in 12ccmNa_2CO_3 $^n/_1$-Lös. gelöst auf 100 ccm aufgefüllt — entsprechend 221,6 mg $\bar{U}$.	109,3
	400	12	Ag IX 50	—		207,4
	400	12	Ag X 50	—		269,5
	400	12	—	50	circa 1000 mg nucleinsaures Natrium in 100 ccm H_2O gelöst — entsprechend 0,250 mg $\bar{U}$.	124,0
	400	12	Ag IX 50	—		230,0
	400	12	Ag X 50	—		284,0

Tabelle 10.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\bar{U}$ mg
	360	12	—	150	—	15,8
500 g +1500ccm destilliertes Wasser	360	12	—	50	circa 1,3 g nucleinsaures Natrium in	178,0
	360	12	Ag XV 5	45	100 ccm Wasser gelöst	260,0
	360	12	id. 50	—	— entsprechend 0,330 mg $\bar{U}$.	309,0

Es erübrigte uns über die gleichen Verhältnisse bei der Urikolyse näher zu unterrichten, Die Versuchsanordnung wich von der vorhergehenden insofern ab, als Zusatz von harnsaurem Na stattfand, an Stelle der Schüttelung Durchleitung eines kräftigen Luftstromes trat und zur Verhütung von Fäulnis außer Toluol Chloroform im Überschuß hinzugesetzt wurde. Wir wollen gleich vorausschicken, daß wir hier zu unserer Überraschung einem ganz abweichenden Verhalten begegneten. Der Einfachheit der Darstellung halber gehen wir von der Beschreibung der Versuche mit Nierenauszügen aus, bei welchen vorwiegend die Urikolyse in Betracht kommt (7) und die gleichzeitige Beeinflussung der $\bar{U}$-Bildung die Resultate weniger trübt.

Tabelle 11.

Menge des Nierenbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\bar{U}$ mg
70 g +700ccm physiologische Kochsalzlösung	250	12	—	50	Ungefähr 0,5 gr harnsaures Natrium in 5 ccm	118,2
	250	12	Ag VIII 5	45	$^n/_1$-NaOH gelöst, auf	146,1
	250	12	id. 50	—	50 ccm aufgefüllt — entspechend 296,8 mg $\bar{U}$	172,1

Tabelle 12.

Menge des Nieren-breies	Kolatur ccm	Versuchs-dauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\bar{U}$ mg
250 g +1600ccm destilliertes Wasser	250	10	—	50	Ungefähr 0.7 gr harnsaures Natrium in 50 ccm $^n/_1$-Na_2CO_3-Lösung gelöst — auf 100 ccm aufgefüllt — entsprechend 402,5 mg $\bar{U}$	69,7
	250	10	$Fe(OH)_3$ III 0,5	49,5		67,0
	250	10	id. 5,0	45,0		68,9
	250	10	As_2S_3 III 0,4	49,5		71,5
	250	10	id. 5,0	45,0		74,0
	250	10	Ag IX 50	—		208,3
	250	10	Ag VIII 50	—		238,4

Tabelle 13.

Menge des Nieren-breies	Kolatur ccm	Versuchs-dauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\bar{U}$ mg
200 g + 1 Liter physiologische Kochsalzlösung	250	48	—	50	Ungefähr 0.5 gr harnsaures Natrium, entsprechend 303 mg U — in 3 ccm $^n/_1$-NaOH gelöst, auf 25 ccm aufgefüllt	Murexidprobe negativ
	250	48	Ag XII 5	45		
	250	48	id. 50	—		

Tabellen 11—13 entnehmen wir, daß die $\bar{U}$-Zerstörung durch Nierenextrakte vom Silberkolloid in jedem Verhältnisse merklich gehemmt wird, während Ersen und Arsen sowohl in geringen als in ziemlichen Mengen sich indifferent verhalten. Die Hemmung ist, im Vergleich zur Anfachung der $\bar{U}$-Bildung in der Milz, zwar geringer, immerhin aber deutlich.

Die eigentümliche Wirkung des kolloiden Ag veranlaßte uns, seinen Einfluß auf Lösungen von harnsaurem Na zu prüfen, und wir überzeugten uns, daß es nach einigen Stunden (je nach der zugesetzten Menge) Fällung hervorruft. Deshalb neigten wir der Ansicht zu, die Ursache der beobachteten Hemmung sei in dieser Fällung zu suchen. Weitere Versuche überzeugten uns jedoch, daß diese Auffassung keine zutreffende ist, oder zum mindesten der Einschränkung bedarf, indem bei längerer Versuchsdauer (Tabelle 13) die Harnsäure, trotz Zusatzes von Silberkolloid, durch Nierenkolatur restlos zerstört wird. Demnach bedarf es zur befriedigenden Deutung der beobachteten Erscheinung weiterer Versuche.

Gehen wir nun zur Analyse des Einflusses unserer Kolloide auf die $\overline{U}$-Zerstörung in Leberkolaturen über. Ihre Beurteilung wird durch die in der Leber gleichzeitig ablaufende und von den Kolloiden begünstigte $\overline{U}$-Bildung nicht unerheblich erschwert, und wir stehen hier einem Wechselspiele zum Teil in entgegengesetztem Sinne beeinflußter Prozesse, über den wir uns nur unter Zugrundelegung der schon gewonnenen Erfahrungen einigermaßen zurechtfinden können, gegenüber. Vergegenwärtigen wir

Tabelle 14.

Menge des Leberbreies	Kolatur	Versuchsdauer	Zugesetzte kolloidale Lösung	Destilliertes Wasser	Zusatz	$\overline{U}$ mg
	ccm	Stunden	ccm	ccm		
1500 g + 5000 ccm physiologische Kochsalzlösung	570	4	—	50	Ungefähr 0,5 gr harnsaures Natrium in 5 ccm $^n/_1$-NaOH gelöst, auf 50 ccm aufgefüllt — entsprechend 289,6 mg $\overline{U}$	254,8
	570	4	—	50[1]		254,3
	570	4	Ag III 5	45		275,0
	570	4	id. 50	—		326,0
	570	4	$Fe(OH)_3$ III 0,5	49,5		290,2
	570	4	id. 5,0	45,0		232,1
	570	4	As_2S_3 III 0,5	49,5		284,8
	570	4	id. 5,0	45,0		190,2

[1]) Mit 21,5 $^n/_{100}$-HCl versetzt, entsprechend der Acidität von 5 ccm $Fe(OH)_3$.

Tabelle 15.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\overline{U}$ mg
1000 g + 2000 ccm destilliertes Wasser	300	18	—	50	Ungefähr 0,7 gr harnsaures Natrium in 50 ccm $^n/_1$-Na_2CO_3-Lösung gelöst, auf 100 ccm aufgefüllt — entsprechend 402,5 mg $\overline{U}$	9,0
	300	18	$Fe(OH)_3$ III 0,5	49,5		146,0
	300	18	id. 5,0	45,0		48,0
	300	18	As_2S_3 0,5	49,5		178,0
	300	18	id. 5,0	45,0		33,0
	300	18	Ag X 50	—		123,0
	300	18	Ag IX 50	—		146,0

Tabelle 16.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\overline{U}$ mg
1000 g + 2500 ccm physiologische Kochsalzlösung	500	12	—	50	Ungefähr 0,7 gr harnsaures Natrium in 5 ccm $^n/_1$-NaOH gelöst, auf 50 ccm aufgefüllt — entsprechend 460,9 mg $\overline{U}$	212,9
	500	12	Ag X 5	45		371,3
	500	12	id. 50	—		497,2
	500	12	$Fe(OH)_3$ 0,5	49,5		436,9
	500	12	id. 5	45,0		176,0

uns, daß die Harnsäurebildung durch kolloides Silber seine durch $Fe(OH)_3$ und As_2S_3 (in kleinen Mengen) begünstigt wird, ihre Zerstörung aber durch Ag schwach gehemmt, durch $Fe(OH)_3$ und As_2S_3 unberührt bleibt. Trifft derselbe Sachverhalt — und es liegt kein Grund vor, diese Annahme a priori zurükzuweisen — auch für die Leber zu, in welcher beide Prozesse sich nebeneinander abspielen, so wäre eine scheinbare, durch Anfachung der Harnsäurebildung bedingte Hemmung der Uri-

kolyse durch alle drei Kolloide zu erwarten, welche sich auch tatsächlich in Tabellen 14, 15, 16 kundgibt. Zu dieser dürfte sich in den Silberversuchen eine reelle Verzögerung gesellen, und eine solche ist auch den Protokollen zu entnehmen. Es fallen nämlich die höchsten $\overline{U}$-Werte auf den Zusatz von 50 ccm Ag (und dürften zum größten Teile auf Anfachung der $\overline{U}$-Bildung, zum geringeren auf Hemmung ihrer Zerstörung beruhen); es folgen die $\overline{U}$-Zahlen bis Zusatz von 0,5 ccm $Fe(OH)_3$ und As_2S_3 (Aktivierung der $\overline{U}$-Bildung) und zuletzt jene der Versuche mit 5 ccm Ag (schwache Anregung der $\overline{U}$-Bildung, geringfügige Verhinderung ihrer Zerstörung).

Größere Mengen (5 ccm) $Fe(OH)_3$ und As_2S_3 bedingen, wie wir sahen, alleinige Verzögerung der $\overline{U}$-Bildung, womit die diesbezüglichen Resultate in Tabellen 14 und 16 im Einklang stehen. Nicht unerwähnt möchten wir jedoch den Umstand lassen, daß wir über einen 18 stündigen Versuch verfügen (Tafel 15), der zu einem in dieser Hinsicht abweichenden Ergebnis führt, der sich vorläufig der Erklärung entzieht.

Überblicken wir die hervorgegangenen Ergebnisse mit Bezugnahme auf die eingangs vorgelegte Fragestellung, so entnehmen wir denselben eine erfreuliche qualitative Übereinstimmung mit der Stoffwechselwirkung des kolloidalen Silbers, indem dasselbe auch in vitro eine Beschleunigung der Harnsäurebildung entspricht. Die Beziehungen der beobachteten Hemmung der Urikolyse zu den Vorgängen im lebenden Organismus entziehen sich der Beurteilung, da das Problem der Produkte des $\overline{U}$-Abbaues schon unter physiologischen Bedingungen nicht endgültig geklärt ist.

Nachdem die Frage des prinzipiellen Einklanges der Kolloidwirkung im Organismus und Reagensglas in befriedigender Weise gelöst war, war es an der Zeit, an die Beantwortung des weiteren heranzutreten, ob auch die quantitativen Verhältnisse eine annähernd entsprechende Ähnlichkeit erkennen ließen. Die fraktionierten Harnanalysen und die gesonderte Bestimmung der Harnsäure hatten nämlich bei den Versuchen am Menschen (2) die Aktivierung des Nucleinumsatzes stark in den Vordergrund gestellt; entsprach nun derselben auch im Reagensglas eine ähn-

lich überwiegende Anfachung des Abbaues der Nucleinstoffe? Eine Entscheidung vorliegender Frage konnte auf dem Wege angebahnt werden, daß die Beschleunigung der Gesamtautolyse und des Nucleinabbaues bei Zusatz geringster, die Autolyse eben nach anregenden Kolloidmengen miteinander verglichen wurden, da erst eine Annäherung an die minimalen Mengen, die in den Selbstversuchen herangezogen werden und statthaft waren, verwirklicht war.

Tabelle 17.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	H_2O ccm	Gesamt-N gr	Gesamt-$\overline{U}$ mg	Gesamt-N$\overline{U}$ mg
800 g + 4 Liter destilliertes Wasser	880	72	—	50	1,714	25,3	8,43
	880	72	Ag XIV 1	49	1,767	38,0	12,66
	880	72	id. 5	45	1,868	78,0	26,00
	880	72	id. 10	40	1,926	88,4	29,46
	880	72	id. 50	—	2,027	101,0	33,66

Tabelle 18.

Menge des Leberbreies	Colatur ccm	Versuchsdauer Stunden	Zugesetzte kolloidale Lösung ccm	H_2O ccm	Gesamt-N gr	Gesamt-$\overline{U}$ mg	Gesamt-N$\overline{U}$ mg
1000 g +3,5Liter destilliertes Wasser	360	48	—	50	354,0	15,8	5,26
	360	48	Ag XIV 0,5	49,5	361,2	24,2	8,07
	360	48	id. 2,0	48,0	375,2	41,0	13,66
	360	48	id. 5,0	45,0	431,2	62,1	20,70
	360	48	id. 8,0	42,0	523,6	71,6	23,9
	360	48	id. 10,0	40,0	548,8	83,1	27,7

Aus Tabellen 17 und 18 ersehen wir, daß auch in vitro der Nucleinumsatz durch das Ag-Kolloid elektiv

beeinflußt wird, in dem Sinne, daß minimale Mengen 0,00015 g pro 100 g Leber) die $\bar{U}$-bildung relativ stärker und deutlicher aktivieren als die Gesamtautolyse; letztere wird erst bei Heranziehung etwas größerer Mengen besonders begünstigt.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

1. Zwischen der Stoffwechselwirkung des kolloiden Ag und der Beeinflussung der Autolyse durch dasselbe besteht eine prinzipielle Übereinstimmung.

2. Minimale Mengen Ag begünstigen die Harnsäurebildung vorwiegend im Verhältnis zur Gesamtautolyse.

3. Die bei der Harnsäurebildung beteiligten Fermente werden durch Zusatz von Kolloiden (Ag, $Fe(OH)_3$, As_2S_3) aktiviert.

4. Größere Mengen $Fe(OH)_3$ und As_2S_3 bewirken Hemmung der Harnsäurebildung.

5. Die Urikolyse wird durch Ag verlangsamt; $Fe(OH)_3$ und As_2S_3 verhalten sich derselben gegenüber indifferent.

Literatur.

1. M. Ascoli und Izar, Berl. klin. Wochenschr. **1907**, Nr. 4.
2. Dieselben, Diese Zeitschr. **5**, 394, 1907. — Berl. klin. Wochenschr. **1907**, Nr. 21.
3. Dieselben, Diese Zeitschr. **6**, 192, 1907.
4. Wiener, H., Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. **40**, 42.
5. Burian, R., Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**.
6. Schittenhelm, A., Daselbst **45**, 46.
7. Derselbe, Daselbst **45**.

Über die Wirkung lipoidlöslicher Stoffe auf rote Blutkörperchen.

Von

J. Traube.

(Eingegangen am 6. Mai 1908.)

In Pflügers Archiv f. d. ges. Physiol. 105, 541 u. 559, 1904, sowie namentlich in einer neuen daselbst im Erscheinen begriffenen Abhandlung habe ich Ansichten über das Wesen der osmotischen Kraft entwickelt, welche von der herrschenden Ansicht wesentlich abweichen, und auf welche ich hier um so mehr verweisen möchte, als die hier folgenden Mitteilungen im engsten Zusammenhange zu jener erwähnten Arbeit stehen.

Die Übereinstimmung der plasmolytischen Ergebnisse Overtons und meiner kapillarimetrischen Untersuchungen hat zu dem Satze geführt:

Wenn durch eine Membran zwei wäßrige Lösungen getrennt sind, so wird die Richtung der Osmose durch die Differenz der Oberflächenspannungen der beiden Lösungen (gegen Luft) bestimmt, und zwar in der Weise, daß die Lösung mit geringerer Oberflächenspannung in Richtung derjenigen mit größerer Oberflächenspannung diosmiert.

Die Richtigkeit dieses Satzes wurde an den mannigfaltigsten physiologischen und biologischen Vorgängen geprüft und ausnahmslos bestätigt gefunden.[1])

Nach einem sehr wichtigen, thermodynamisch und experimentell bestätigten Theorem von Willard Gibbs haben nun Stoffe, welche die Oberflächenspannung eines Lösungsmittels

[1]) J. Traube und F. Blumenthal, Arch. f. experim. Pathol. u. Ther. 22, 117, 1906 und A. Bickel, Deutsche med. Wochenschr. 1905, 28.

verringern, das Bestreben, in die Oberfläche zu wandern, so daß die Konzentration in der Oberflächenschicht bei solchen Lösungen größer ist als inmitten der Flüssigkeit. Dieser Satz weist darauf hin, daß der Haftdruck, mit welchem verschiedene Stoffe in der Lösung haften, d. h. an Lösungsmittel gekettet sind, sehr verschieden sein kann, und wir können das Theorem von Gibbs auch in die Worte kleiden:

Je mehr ein Stoff die Oberflächenspannung des Lösungsmittels vermindert, um so geringer ist sein Haftdruck.

Daraus ergibt sich aber sofort eine einfache und höchst bemerkenswerte Beziehung von Verminderung der Oberflächenspannung, Adsorption und Teilungskoeffizienten bzw. Lipoidlöslichkeit; denn bringen wir die wäßrige Phase etwa mit festen Phasen, wie Blutzellen, Bakterien, Membranen, zusammen, oder einer anderen Flüssigkeit, etwa einem Lipoide, so werden diejenigen Stoffe, welche die Oberflächenspannung des Wasses am meisten erniedrigen, sich in größter Konzentration an der Oberfläche der fremden Phase ansammeln und damit zur Adsorption, sowie zur Lösung in der fremden Phase am ehestem geneigt sein; daher die Adsorptionen solcher Stoffe und Hautbildungen, daher Overtons Beziehungen von osmotischer Kraft und Lipoidlöslichkeit, denn im allgemeinen (aber keineswegs immer, vgl. Peptone[1]) usw.), haben diejenigen Stoffe, welche einen geringen Haftdruck im Wasser haben, einen großen Haftdruck in Lipoiden. Entscheidend ist aber diese Differenz der Haftdrucke für die osmotische Richtung und bis zu einem gewissen Grade auch für die osmotische Geschwindigkeit.[2]) Wo also Lipoide vorhanden sind, kann man die Teilungskoeffizienten nach Overton als Maß der osmotischen Kraft ansehen, indessen meine Theorie ist wesentlich weitgehender, indem sie die Differenz der Haftdrucke oder Oberflächenspannungen an Stelle der Teilungskoeffizienten setzt, ganz allgemein, ohne die besondere Hypothese aufzustellen, daß in allen Fällen beim Eintritt in die Zellen erst Lipoidhüllen durchquert werden müssen.

Zu den Stoffen mit geringem Haftdrucke im Wasser ge-

[1]) Siehe J. Traube und F. Blumenthal l. c.

[2]) Siehe l. c. Pflügers Archiv.

hören nun beispielsw. die gewöhnlichen Alkohole, Ester, Äther, Ketone usw., ferner Stoffe wie Saponin, Gallen- und Fettsäuren und vor allem auch die Kolloide.[1])

Setzen wir rote Blutkörperchen in die auf physiologische Kochsalzstärke gebrachten Lösungen zunächst indifferenter lipoidlöslicher Stoffe (wie Alkohole, Ester usw.), so wird, da hier eine Lipoidhülle zweifellos vorhanden ist, ein Eindringen jener Stoffe in die Lipoidhülle erfolgen müssen. Zunächst wird das Blutkörperchen infolge der Druckdifferenz eine vorübergehende Schrumpfung zeigen müssen, wie solche auch u. a. von Baumgarten[2]) beobachtet wurde; alsdann aber in dem Maße, wie der betreffende Stoff sich in der Lipoidhülle mehr und mehr konzentriert, um allmählich die Konzentration in der wäßrigen Phase zu übertreffen, wird ein Gegendruck erzeugt, welcher von innen nach außen führt, eine Dilatation des Blutkörperchens bewirkt, um schließlich bei einem gewissen Schwellenwerte einen Hämoglobinaustritt unter Zerstörung der Zelle herbeizuführen.

Da bei verschiedenen Blutkörperchen, welche sich in derselben Lösung befinden, dieser Schwellenwert annähernd gleichzeitig erreicht werden wird, so muß bei dieser durch mechanische Kräfte erzeugten Hämolyse die Hämolyse der verschiedenen Blutkörperchen viel plötzlicher eintreten, als dies bei hämolytischen Vorgängen der Fall ist, bei welchem chemische Vorgänge mitwirken.

Wird andererseits obiger Schwellenwert nicht erreicht, in dem die Blutkörperchen in Lösungen gesetzt werden, deren Konzentration nicht hinreicht, um die Hämolyse auszulösen, so erfolgt eine Verdickung der Lipoidschicht, welche die Stabilität der Blutkörperchen gegen andere Hämolytika ändern muß.

Im allgemeinen wird die Differenz der Haftdrucke des betreffenden Stoffes im Lipoide und in der wäßerigen Phase entscheidend sein für den Eintritt der Hämolyse; wir können also nicht erwarten, daß hier lediglich die Oberflächenspannug der wässerigen Phase die hämolytische Wirkung bestimmt.

Dahingegen ist bei naheverwandten, bzw. homologen Stoffen

[1]) Siehe darüber meine neueste Arbeit, Pflügers Archiv, Anmerk. auf der letzten Seite.

[2]) Baumgarten, Berl. klin. Woch. 1901, Nr. 50.

die Oberflächenspannung der lipoiden Phase kaum verschieden, und hier können wir erwarten, daß die Oberflächenspannung der wäßerigen Phase allein den hämolytischen Vorgang regelt.

Ich habe nun früher[1]) gefunden, daß wäßerige Lösungen, welche 1 Mol. Methyl-, $^1/_3$ Äthyl- $^1/_9$ Propyl- und $^1/_{27}$ Butylalkohol . . . (oder entsprechende Ester usw.) enthalten, isokapillar sind, d. h. gleiche Oberflächenspannung besitzen; für derartige Lösungen muß somit auch, wenn die Theorie richtig ist, die hämolytische Geschwindigkeit gleich groß sein, ausgenommen sind natürlich Säuren und Basen, bei deren hämolytischer Wirkung zweifellos auch chemische Vorgänge mit in Betracht kommen.

Die hier gegebene Theorie wird nun durch die Versuche in jeder Hinsicht bestätigt.

Führer und Neubauer[2]) haben rote Blutkörperchen in äquivalente Lösungen von Alkoholen, Estern usw. eingeführt. Aus ihren Zahlen seien nur die folgenden Quotienten der Schwellenwerte (Reaktionsgeschwindigkeiten) wiedergegeben.

Äthylalkohol 3 ,0	Äthylacetat
Propylalkohol 3,4	Propylacetat 3,0
Butylalkohol	Butylacetat 3,0
Amylalkohol 3,5	Äthylurethan
Heptylalkohol	Propylurethan 3,0
Octylalkohol 3,0	

Man erkennt, daß dem von mir gefundenen Capillargesetze entsprechend, im allgemeinen die hämolytische wie capillare Wirkung bei Anwendung äquivalenter Lösungen zunimmt im Verhältnis $1:3:3^2:3^3$....

Die methylierten Anfangsglieder der Reihen, bei welchen sich größere Abweichungen finden, wurden fortgelassen, weil hier die Schwellenwerte zu große Konzentrationen ergaben, und das Capillargesetz nur für verdünnte Lösungen gilt.

Bei den gleichfalls untersuchten Fettsäuren und Aminen gilt zwar das Capillargesetz, aber der Erwartung gemäß nicht das hämolytische Gesetz; schon die Wirksamkeit minimaler

[1]) Vgl. Pflügers Archiv l. c.

[2]) Führer und Neubauer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 56, 333, 1907.

Säure- bezw. Alkalimengen, die Veränderung der Farbstoffe usw. machen hier chemische Wirkungen unzweifelhaft. Bei den von Führer und Neubauer untersuchten Stoffen mit großem Haftdruck und geringer Lipoidlöslishkeit wie die Säureamide hat obiges Gesetz auch in capillarer Beziehung keine Gültigkeit.

Ich selbst habe nach der Methode von Führer und Neubauer eine Anzahl Lösungen auf ihre hämolytische Wirksamkeit untersucht und gleichzeitig die Oberflächenspannungen bestimmt.

Je 6 Tropfen[1]) 50 %iger gut gewaschener Blutkörperchen vom Rinde wurden sie bei Zimmertemperatur zusammengebracht mit 10 ccm verschieden starker Lösungen der genannten Stoffe, welche durch Verdünnung mit $2 \times 0{,}85$ %iger Kochsalzlösung auf physiologische Kochsalzstärke gebracht worden waren. Wegen der verschiedenen Resistenz verschiedener Blutkörperchen wurde stets zum Vergleich eine Standardlösung gewählt. Es wurden die relativen molaren Konzentrationen bestimmt, bei denen die vollständige Hämolyse in gleichen Zeiten eintrat.

Hierbei sei bemerkt, daß bei derselben Suspension auch die vollständige Klärung sehr spontan erfolgte (siehe oben). Die capillaren Steighöhen wurden bei etwa 17° mit einem Rohre bestimmt, welches für Wasser bei jener Temperatur die Steighöhe = 91,5 mm ergab.

	Relative Schwellenwertkonzentrationen in Molen pro Liter Lösung	Capillare Steighöhe bei 17°
Methylalkohol	8,6	54,5 mm
Äthylalkohol	4,1	49,7 „
Propylalkohol	1,40	49,1 „
Isoamylalkohol	0,175	43,2 „
Dimethyläthylcarbinol	0,67	41,9 „
Aceton	3,00	54,5 „
Methyläthylketon	1,10	54,0 „
Methylacetat	1,30	55,0 „
Urethan	1,22	62,5 „
Propionitril	0,75	61,0 „
Essigsäure	0,015	91,0 „

[1]) Mit dem von mir konstruierten bekanntenTropfglase T. K. entnommen.

Meine Versuche bestätigen zunächst die Ergebnisse der Arbeit von Führer und Neubauer für homologe Stoffe. Das Verhältnis der Schwellenwerte für Äthyl und Propylalkohol ist = 2,9, für Aceton und Methyläthylketon = 2,7.

Die Versuche lehren ferner, daß beim Vergleich nicht homologer Stoffe auch der Haftdruck in der lipoiden Phase zu berücksichtigen ist, denn käme nur die wässerige Phase in Betracht, so müßte die Steighöhe bei der Schwellenwertkonzentration in allen Fällen gleich groß sein.

Daß bei der Essigsäurehämolyse inerster Linie chemische Wirkungen in Betracht kommen, ergibt sich mit Sicherheit, wenn man den Steighöhenwert beobachtet, welcher sich nur um 0,5 mm von demjenigen des Wassers unterscheidet.

Nach mehr als einer Richtung bemerkenswert sind die folgenden Versuche:

Eine gesättigte i-Amylalkohollösung wurde mittels einer zweifach physiologischen NaCl-Lösung auf physiologische Kochsalzstärke gebracht. Die so erhaltene Konzentration sei = 1 bezeichnet, und durch Verdünnung mit NaCl-Lösung wurden hieraus Konzentrationen 0,5, 0,25 und 0,125 hergestellt.

Je 2 ccm dieser verschiedenen Konzentrationen wurden nun

1. mit 2 ccm 3mal gewaschener 5%iger Pferdeblutkörperchen und 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung versetzt,
2. mit 2 ccm 5%iger Pferdeblutkörperchen und 2 ccm einer 10%igen Hämoglobinlösung.

Über die Herstellung dieser Hämoglobinlösung (= Blutkörpercheninhalt) siehe die drittfolgende Arbeit von Traube und Goldenthal. Hier sei nur bemerkt, daß das Hämoglobin hämolytisch wirkt und zu diesem Zwecke als hämolytisches Agens zugesetzt wurde. In den Kontrollösungen wurde an Stelle der Amylalkohollösung physiologische Kochsalzlösung zugesetzt.

Amylalkohol Konzentration	Lösungen ohne Hämoglobin			Lösungen mit Hämoglobin	
	n. 1½ Tg.	n. 3 Tg.	n. 6 Tg.	n. 1½ Tg.	n. 3 Tg.
1	völl. trübe	völl. trübe	völl. trübe	½ klar	völl. klar
0,5	„ „	ger. Häm.	„ klar	¾ „	„ „
0,25	„ „	völl. klar	„ „	völl. „	„ „
0,125	„ „	„ „	„ „	„ „	„ „
0,0	„ klar	„ „	„ „	„ „	„ „

Einige Versuche mit Äthylalkohollösungen verliefen in analoger Weise.

Veröffentlicht seien noch die folgenden Versuche mit Rindergalle, zumal dieselben bei ikterischen Erkrankungen aktuelle Bedeutung haben.

Frische Rindergalle wurde mit 0,85 %iger Kochsalzlösung auf das 10fache verdünnt. Diese Konzentration wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf das Doppelte, 4fache usw. verdünnt.

2 ccm diesen Lösungen wurden mit 2 ccm 5 %iger Pferdeblutkörperchen und 2 ccm Kochsalzlösung bzw. 2 ccm 10 %iger Hämoglobinlösung (Blutkörpercheninhalt) versetzt. In den Kontrollösungen wurde die Gallenlösung durch NaCl-Lösung ersetzt.

Konz. der	ohne Hämoglobin			mit Hämoglobin		
Gallenlösg.	n. 10 Std.	n. 20 Std.	n. 30 Std.	n. 10 Std.	n. 20 Std.	n. 30 Std.
1:10	3/4 klar	völl. klar	völl. klar	3/4 klar	völl. klar	völl. klar
1:20	völl. trübe	1/3 klar	„ „	völl. trübe	1/2 klar	3/4 klar
1:40	„ „	völl. trübe	e. w. kl.	„ „	völl. trübe	w. klar
1:80	„ „	„ „	völl. trübe	„ „	„ „	1/2 klar
1:160	„ „	„ „	„ „	„ „	1/2 klar	völl. klar
1:320	„ „	„ „	„ „	„ „	völl. trüb.	1/2 klar
1:640	„ „	„ „	„ „	„ „	2/3 klar	3/4 klar
1:1280	„ „	„ „	„ „	„ „	3/4 klar	völl. klar
Kontroll.	„ „	„ „	„ „	3/4 „	„ „	„ „

Die Tabellen zeigen, daß die lipoidlöslichen Stoffe (wie Amylalkohol, Galle usw.), welche oberhalb eines gewissen Schwellenwertes als Hämolysine wirken, unterhalb jenes Schwellenwertes eine antihämolytische Wirkung ausüben, denn, wie die Versuche mit Amylalkohol lehren, wird u. a. die Kontrollösung weit schneller geklärt als die Lösungen mittlerer Konzentrationen. Die Konzentration = 1 für Amylalkohol zeigte noch nach 6 Tagen keinen Hämoglobinaustritt, während dieselben Blutkörperchen ohne Amylalkoholhülle schon nach $1^1/_2$ Tagen völlig hämolysiert waren und ebenso Amylalkohollösungen von stärkerer Konzentration bereits in Zeiträumen von weniger als 1 Stunde hämolysierend wirken (siehe Tabelle Seite 2 dieser Arbeit).

Bei den Gallenlösungen zeigen sich für mittlere Kon-

zentrationen gewisse Unregelmäßigkeiten, die — vielleicht — auf Fehlerquellen zurückzuführen sind. Aber es zeigt sich, daß bei mittleren Konzentrationen eine geringere hämolitische Wirkung vorhanden ist, als bei der Kontrollösung. Gewisse Widersprüche in den Angaben über die blutkörperchenzerstörende Wirkung der Galle[1]) bei Ikterus scheinen hiermit in Zusammenhang zu stehen.

Ich will noch zur Beurteilung der Oberflächenspannung der betreffenden Lösungen bemerken, daß in einem Stalagmometer (siehe Anm. auf folgender Seite), welches für Wasser die Tropfenzahl = 46 ergab, die Amylalkohollösung Konz. = 1 91 Tropfen, Konz. = 0,125 58 Tropfen ergab. Die Gallenlösung 1:20 ergab 71 Tropfen, 1:640 = 57 Tropfen.

Biologisch von großer Bedeutung ist noch die Tatsache, daß derartige lipoidlösliche Stoffe von geringem Haftdrucke in kolloidalen Lösungen sich häufig mit Kolloidhüllen umgeben. und dadurch in ihrer hämolytischen Wirksamkeit gehindert werden, während gleichzeitig ihre Wirkung auf die Oberflächenspannung des Wassers durch die Kolloidhülle nicht zum Vorschein kommt.

Eine wässerige Lösung von Sapo medicinalis von 0,05 % Saponingehalt ergab in einem Stalagmometer[2]), in welchem die Tropfenzahl für Wasser bei 15° = 46 war, eine Zahl von 90 Tropfen, während der Zusatz von nur 2 Th. Gelatine zu 100 Th. dieser Lösung die Zahl auf 52 Tropfen verringerte. Eiweiß wirkte in analoger Weise.

Dementsprechend ergab eine Mischung von
4 ccm ($^1/_{100}$ Seife + $^7/_{100}$ Wasser) + 4 ccm 1,7 % NaCl-Lösung + 4 ccm 5 %iger Hammelblutkörperchen sofortige Hämolyse, während eine Mischung von
4 ccm ($^1/_{100}$ Seife + $^7/_{100}$ 2 % Nelsongelatine) + 4 ccm 1,7 % NaCl-Lös. + 4 ccm 5 %iger Hammelblutkörperchen noch nach 3 Tagen keine Spur von Hämolyse zeigten.

Gleichartige hämolytische Versuche mit Eiweiß hat

---

[1]) Vgl. Grawitz, Handb. d. Blutunters. S. 598 u. 599.

[2]) Für medizinische Zwecke justierte Stalagmometer sind zu beziehen durch C. Gerhardt, Lager chem. Utensilien, Bonn. Die Methode ist äußerst einfach. Vgl. darüber die Anmerk. meiner neuesten Arbeit, Pflügers Archiv.

übrigens schon L. von Liebermann[1]) ausgeführt, auf dessen schöne Untersuchungen ich in der folgenden Arbeit noch zurückkommen werde.

Die a. a. O.[2]) zu besprechenden Oberflächenspannungsgrößen, ferner die Hautbildung, die Beziehungen der hochmolekularen Kolloide zu den Emulsionen weisen darauf hin, daß derartige Kolloide, wie Eiweiß, sowie auch Lecithin, Mastix Stoffe sind, deren Haftdruck gegenüber dem Wasser nahezu = 0 ist, während der Haftdruck bei Peptonen und Albumosen sehr gering aber wesentlich größer als für Eiweiß ist. Die letzten Abbauprodukte des Eiweißes, wie Glykokoll, zeigen demgegenüber recht erhebliche Haftdrucke. Aus diesen Feststellungen erklärt sich das abweichende Verhalten der Kolloide in bezug auf die osmotische Theorie, und ich verweise in dieser Beziehung auf meine demnächst in physikochemischen Zeitschriften erscheinenden umfassenden Mitteilungen.

[1]) Archiv f. Hygiene 62, 527.

[2]) Vgl. Pflügers Arch. l. c.

Zur Komplementfrage.

Von

J. Traube.

(*Eingegangen am 6. Mai 1908.*)

Wenn man ein beliebiges Serum einige Zeit auf etwa 56° erhitzt, so geht eine bemerkenswerte physikalische Veränderung vor sich. Die Oberflächenspannung erfährt eine sehr erhebliche Änderung; es bilden sich Stoffe von geringem Haftdruck, welche die Oberflächenspannung des Serums erniedrigen.

Was die Erscheinung noch beachtenswerter macht, ist der Umstand, daß diese Stoffe zwar bei längerem Stehen des inaktivierten Serums erhalten bleiben, daß sie dagegen wieder verschwinden, sobald dem inaktivierten Serum aktives Serum zugesetzt werden. Es findet somit in diesem Falle eine offenbare umkehrbare Reaktion statt.

Von den zahlreichen nach dieser Richtung angestellten übereinstimmend verlaufenen Versuchen mit Rinder-, Schweine- und Hammelserum seien nur die folgenden erwähnt.

In einem Stalagmometer, welcher für Wasser bei 17° 46,3 Tropfen ergab, zeigten frische Rinder- und Schweinesera Tropfenzahlen von 51,9 bis 52,6 Tropfen. Wurde ein derartiges Serum $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunde auf etwa 56° erhitzt, so stieg die Tropfenzahl auf 57 bis 59 Tropfen; die Oberflächenspannung wird somit in erheblicher Weise erniedrigt.

Bei einem derartigen Versuche zeigte das frische Serum 51,9 Tropfen, nach $^1/_2$stündigen Erhitzen auf 56° war die Tropfenzahl = 58,2. Ein Teil dieses Serums wurde 18 Stunden lang hingestellt; die Tropfenzahl war alsdann = 56,8 Tropfen. Es hatte somit ein minimaler Rückgang stattgefunden.

Ein anderer Teil wurde nun sogleich nach der Inaktivierung in wechselnden Verhältnissen mit frischem Serum (Tropfenzahl = 51,9) versetzt und die Mischungen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Folgendes sind die Ergebnisse:

Rinderserum		Tropfenzahlen			
Aktives	Inaktives	nach $^1/_2$ Stunde	nach $1^3/_4$ Stunde	nach 6 Stunden	nach 20 Stunden[1])
1 Teil	1 Teil	54,0	53,5	52,6	50,7
3 Teile	1 Teil	55,5	54,2	52,85	51,2
9 Teile	1 Teil	56,9	55,6	54,1	51,8

Wird ein Serum anstatt auf 56° auf eine geringere Temperatur, etwa 40 bis 50°, erhitzt, so erfolgt zwar auch eine Erniedrigung der Oberflächenspannung, aber dieselbe ist weitaus geringer, und der Vorgang wird von selbst wieder rückgängig.

Ein frisches Serum von der Tropfenzahl = 52,0 Tropfen, zeigte nach $2^1/_2$ stündigem Erhitzen auf 47° die Tropfenzahl = 55,0 Tropfen, nach 18 stündigem Stehen war die Tropfenzahl = 52,7 Tropfen.

Nach dem in der vorhergehenden Abhandlung besprochenen Theorem von W. Gibbs werden nun derartige Stoffe, welche die Oberflächenspannung vermindern, sofort adsorbiert oder in Lipoiden gelöst werden müssen, sobald man eine fremde Phase, etwa rote Blutkörperchen, mit dem inaktivierten Serum in Berührung bringt.

Es wird in diesem Falle eine Verdickung der Lipoidschicht eintreten müssen, welche zwar der Verankerung mit einem spezifischen Amboceptor keine Schwierigkeit in den Weg stellt, aber dessen Wirksamkeit ebensosehr erschweren wird, wie dies — siehe die vorhergehende Abhandlung — andere derartige Stoffe von geringem Haftdruck (Galle, Amylalkohol usw.) tun, wenn dieselben unterhalb eines gewissen Schwellenwertes der Konzentration bei Gegenwart eines Hämolysins roten Blutkörperchen zugesetzt werden.

Ich machte demgemäß folgende Versuche:

---

[1]) Daß nach 20 Stunden die Tropfenzahl etwas geringer ist als diejenige des frischen Serums, hängt mit dem Umstande zusammen, daß mehrfach beim Altern der Sera von mir eine Verringerung der Tropfenzahl beobachtet wurde.

2 ccm 5%ige Blutkörperchen (Rind oder Hammel) wurden versetzt mit 1 ccm frischen bzw. 1 ccm inaktivierten Serums dazu setzte ich alsdann 2 ccm der als Hämolysin wirkenden 10%igen Hämoglobin- (= Blutkörpercheninhalt-) Lösung.[1])

Dieser Versuch wurde mit zehn verschiedenen Blutarten wiederholt, und stets mit dem Erfolge, daß die mit frischem Serum behandelten Emulsionen nach $1^1/_2$ bis 2 Tagen völlig klar waren, während die mit inaktiviertem Serum behandelten Emulsionen meist noch nach 4 bis 5 Tagen ein völlig trübes Aussehen hatten.

3 Versuche mit 5%igen verschiedenartigen Hammelblutkörperchen und 10%igem Hämoglobin, bei denen je 2 ccm mit 2 ccm auf das 10fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Seris versetzt wurden, führte zu dem gleichen Ergebnisse. Nach 30 Stunden waren die Emulsionen mit frischem Serum völlig klar, diejenigen mit inaktiviertem Serum durchaus ungeklärt. Die Versuche unterscheiden sich daher in nichts von den Versuchen in der vorhergehenden Arbeit mit Galle, Amylalkohol usw.

Es ist von mehreren Forschern, wie v. Baumgarten,[2]) v. Liebermann,[3]) darauf hingewiesen worden, daß in inaktiviertem Serum beim Zusammentreten verschiedener Blutkörperchen nicht jene Deformierungen beobachtet wurden, welche für die Agglutination charakteristisch sind; man hat demgemäß einen anderen Namen: Agglomeration vorgeschlagen. Mir scheint es, daß diese Beobachtungen in bestem Einklange mit der Annahme stehen, daß die Blutkörperchen in inaktiviertem Serum eine Verstärkung ihrer Hülle erfahren.

Diese Verstärkung der Hülle ist aber nicht lediglich eine Hypothese, sondern sie ist so fest begründet wie das thermodynamisch und experimentell begründete Prinzip von Gibbs selbst, und die Frage drängt sich uns auf, inwieweit die hier beschriebenen Beobachtungen uns Aufklärung geben können über die Natur der sog. Komplemente.

---

[1]) Siehe die vorhergehende Arbeit sowie die folgende Arbeit von Traube und Goldenthal.

[2]) Verhdl. d. Deutsch. pathol. Ges. 5, 46, siehe S. 51.

[3]) Arch. f. Hygiene 62, 277.

Man wäre geneigt folgendes anzunehmen:

Beim Inaktivieren des Serums bilden sich Stoffe von geringem Haftdrucke, welche, da sie die Lipoidhülle verstärken, als Antihämolysine die Wirkung spezifischer und sonstiger Hämolysine abschwächen. Da aber jene Stoffe von geringem Haftdruck auf Zusatz frischen Serums wieder verschwinden, so wirkt das sog. Komplement in der Weise, daß es einen Hemmungskörper, die Hüllsubstanz, zerstört und das Blutkörperchen hinreichend schwächt, so daß es nunmehr dem Angriff des verankerten Amboceptors nicht mehr zu trotzen vermag. Daß manche frische Sera Antikomplemente enthalten, wäre in keiner Weise auffallend, da manche Sera Peptone enthalten (bei Urämie) und beispielsweise die geringste Menge Pepton antikomplementär wirken muß, insofern ja die Hautbildung von Peptonen hinlänglich bekannt ist. Daß ein Amobceptor sich verankern kann, ohne zu wirken, sehen wir ja auch beim Abkühlen der hämolytischen Systeme auf 0°. In dem einen Falle wird die Reaktion durch Verstärkung der Hülle, im anderen Falle durch Erniedrigung der Temperatur beeinträchtigt.

Ob die hier entwickelte Theorie ausreicht, um all den mannigfaltigen Beobachtungen, die von berufenster Seite erfolgt sind, gerecht zu werden, wage ich als Outsider nicht zu entscheiden. Mich selbst hat die Beobachtung stutzig gemacht, daß die Klärung nicht so vollständig erfolgt, wenn ich, wie ich dies auch wiederholt tat, zu den Blutkörperchen erst das inaktivierte Serum und nachher aktives Serum + Hämolysin fügte, als wenn ich das inaktivierte Serum zunächst mit dem aktiven Serum mischte und dieses Gemisch + Hämolysin den Blutkörperchen zusetzte. Ebenso fand ich, daß ältere Sera auf inaktiviertes Serum ebenso wirkten wie frische Sera. Gegen diesen Einwand wäre allerdings geltend zu machen, daß, wie obige Versuche zeigen, selbst auf das 10fache verdünntes inaktiviertes Serum, durch den Zusatz von Blutkörperchen und Hämoglobin auf das 30fache verdünnt, noch stark antikomplementär wirkt, obwohl die Tropfenzahl sich bei dieser Verdünnung nur um einen Bruchteil eines Tropfens von dem gleich konzentrierten aktiven Serum unterscheidet.

Hieraus folgt, daß die geringsten Mengen von Stoffen, welche die Oberflächenspannung vermindern (beispielsweise auch Toxine), welche sich in alten und auch namentlich pathologischen Seris vorfinden mögen, zu gering, um mit Stalagmometer oder Capillarimeter nachweisbar zu sein, antikomplementäre Wirkungen ausüben können.

Ich halte es indessen für sehr wohl möglich, daß meine Annahme allein nicht ausreicht, um sämtlichen Beobachtungen gerecht zu werden. Es wäre ja sehr wohl denkbar, daß verschiedene Umstände beim Inaktivieren der Sera zusammenwirken können; so könnte möglicherweise auch der von Liebermann festgestellte größere Alkaligehalt der inaktivierten Sera in Betracht kommen. Eines indessen möchte ich behaupten: daß die hier gemachten Beobachtungen nicht gleichgültig sind und wenn nicht ausschließlich, so doch sehr wesentlich mit in Betracht kommen bei der Entscheidung über die Frage der unterschiedlichen Wirkung aktiver und inaktivierter Sera.

Ich habe nun bisher die chemische Seite der Frage ganz außer acht gelassen, und da es sich hier in erster Linie um einen physikalischen Vorgang handelt, so ist es für die Theorie auch recht gleichgültig. ob wir wissen, welcher Art die Stoffe sind, die beim Erhitzen des Serums frei werden.

Dennoch setzen mich die schönen Arbeiten von v. Liebermann[1]), dem ich für persönliche Ratschläge noch besonders verpflichtet bin, in den Stand, mir auch hierüber eine Meinung zu bilden. Die Sera enthaltene fettsaure oder gallensaure Salze, deren Wirkung bei gewöhnlicher Temperatur durch die Kolloidhülle (siehe meine vorhergehende Arbeit) kaschiert wird.

Beim Erhitzen tritt nun nach meiner Ansicht in erster Linie eine Hydrolyse ein; dafür spricht der Umstand, daß derartige Hydrolysen beim Erwärmen wäßriger Lösungen von Salzen schwacher Säuren mit Basen hinlänglich bekannt sind; dafür spricht ferner die Reziprozität der Reaktion, die Erhöhung des freien Alkaligehaltes beim Erwärmen der Sera, vor allem auch der Umstand, daß nach meinen früheren

---

[1]) Siehe u. a. diese Zeitschr. 1907 die Arbeiten von v. Liebermann sowie auch Noguchi.

Untersuchungen[1]) freie Fettsäuren und Gallensäuren die Oberflächenspannung des Wassers weit stärker erniedrigen, als deren Salze. Bemerkenswert sind in dieser Beziehung namentlich die folgenden Versuche.

Liebermann wies darauf hin, daß durch Säurezusatz zum frischen Serum dieselbe antikomplementäre Wirkung erzielt wird, wie durch Inaktivieren des Serums. Ich selbst fand, als ich 6 ccm eines frischen Rinderserums tropfenweise (1 Tropfen = 0,06 ccm) mit 0,25 mol. Schwefelsäure versetzte, folgendes:

	Tropfenzahl
6 ccm Rinderserum + 0 Tropfen H_2SO_4	50,8
„ „ + 5 „ „	53,3
„ „ + 10 „ „	57,0
„ „ + 15 „ „	61,3
„ „ + 20 „ „	64,3
„ „ + 30 „ „	64,0

Entsprechende Versuche mit Hammelserum ergaben ein Ansteigen der Tropfenzahl bis 64,6.

Man kann auf diese Weise dem Fett- oder Gallensäuregehalt in Flüssigkeiten wie Blutserum, Mageninhalt, Milch usw. titrieren, vielleicht verdient diese einfache Methode Beachtung.

Wenn man ein solches mit Säure versetztes Serum längere Zeit stehen läßt, so findet offenbar eine sekundäre Reaktion statt; das Serum wird sehr zähe, und Natron bewirkt keinen Rückgang der Reaktion; setzt man dagegen alsbald NaOH zu, so zeigt sich dieselbe Erscheinung, wie beim Vermischen von inaktiviertem Serum mit aktivem Serum. Die Tropfenzahl geht auf den ursprünglichen Wert zurück.

6 ccm frisches Rinderserum (Tropfenzahl 50,8) wurden mit 25 Tropfen 0,25 mol H_2SO_4-Lösung versetzt. Die Tropfenzahl war nunmehr = 65,9 Tropfen. Nach alsbaldigen Zusatze von hinreichenden Mengen Natrons war die Tropfenzahl

nach 5 Minuten = 56,8 (teilweise infolge der Verdünnung)
„ 1 Stunde = 54,0
„ 2 „ = 52,6
„ 18 „ = 51,4

[1]) Vgl. u. a. Anm. Chem. Pharm. 265, 27.

Alles spricht somit für einen hydrolytischen Vorgang beim Inaktivieren des Serums; indessen dieser Vorgang muß mit einem zweiten Vorgange verbunden sein, an welchen physikalisch oder chemisch das Eiweiß beteiligt ist. Es wird Sache der physiologischen Chemiker sein, hierüber Klarheit zu verschaffen.

Mir selbst erscheint die physikalische Seite des Problems weit beachtenswerter als die chemische, denen die Gültigkeit des Princips von Gibs ist von der besonderen chemischen Natur der Stoffe unabhängig.

Zur Frage der Virulenz der Bakterien.

Von

J. Traube.

(Eingegangen am 6. Mai 1908.)

Wenn eine Zelle oder ein Zellkomplex, beispielsweise ein Bakterium, auf einem flüssigen Nährboden sich entwickelt, so werden die Zellen um so lebensfähiger sein, je mehr die osmotische Kraft, welche vom Innern des Zelleibes ausgeht, der osmotischen Kraft der Außenflüssigkeit das Gleichgewicht hält. Zwar werden gewisse Druckunterschiede von der Zellmembran ertragen werden, aber es gibt doch, wie sich aus meinen Beobachtungen an Blutzellen usw. ergibt,[1]) einen Schwellenwert der Druckdifferenz, bei welchem das Bakterium ebenso zugrunde gehen muß, wie jede andere Zelle.

Ähnliche Ansichten sind bereits früher von v. Baumgarten[2]) entwickelt worden, aber v. Baumgarten stand auf dem Boden der osmotischen Theorie und glaubte, daß nur die Zahl der gelösten Teilchen zu beiden Seiten der Membran für den osmotischen Vorgang entscheidend sei.

Ich habe indessen gezeigt, daß die Differenz der Oberflächenspannungen[3]) zu beiden Seiten der Membran, bzw. die die Differenz der Haftdrucke in der wässerigen und Lipoidphase als Maß der osmotischen Kraft gelten müsse. Daraus ergibt sich die nicht abweisbare Folgerung, daß Bakterien, welche auf einem Nährboden von bestimmter Ober-

---

[1]) Siehe die vorhergehende Arbeit „Über die Wirkung lipoidlöslicher Stoffe auf rote Blutkörperchen."

[2]) Verh. d. pathol. Ges. 2, 247 und 5, 46, ferner Berl. klin. Woch. 1901, Nr. 50, S. 1.

[3]) Siehe meine Arbeit Pfügers Arch., letzter Jahrgang.

flächenspannung sich entwickelt haben, vollständig oder größtenteils zugrunde gehen müssen, wenn dieselben auf Nährböden von wesentlich veränderter Oberflächenspannung gesetzt werden.

Peptone erniedrigen die Oberflächenspannung sehr stark, und Bakterien, welche auf einer peptonhaltigen Bouillon gezüchtet sind, können nicht gedeihen, wenn sie in ein Blutserum eingesetzt werden, welches eine nur wenig geringere Oberflächenspannung als das Wasser hat. Dasselbe gilt natürlich umgekehrt. Gerade diejenige Mehrzahl der Bakterien wird zugrunde gehen, deren Bakterienleib mit dem bisherigen Nährboden am besten im Oberflächenspannungsgleichgewicht sich befand, dahingegen wird von denen, welche am wenigsten angepaßt waren, sich nunmehr unter den neuen Bedingungen ein größerer Prozentsatz entwickeln können.

Daß diese Auslese mit einer Änderung der Virulenz verbunden ist, kann nicht auffallen. Soll die Lebensfähigkeit und Virulenz der ursprünglichen Art bewahrt werden, so hat man Sorge zu tragen, daß (abgesehen von anderen bekannten Faktoren) die Oberflächenspannung des neuen Nährbodens derjenigen des alten Nährbodens gleicht. Will man andererseits die Virulenz in bestimmter Weise ändern, so wird man die Oberflächenspannung des Nährbodens ganz allmählich in systematischer Weise ändern müssen.

Zu berücksichtigen ist, daß, wie rohe Versuche von mir ergaben, die Bakterien bei ihrem Wachstum durch Verbrauch von Pepton usw. selbst die Oberflächenspannung des Nährbodens verändern, und ihr Wachstum, der Stillstand desselben, die Veränderung der Virulenz ist offenbar auf das engste damit verknüpft.

Sehr bemerkenswert vom Standpunkte der hier entwickelten Ansichten ist das unterschiedliche Verhalten des gewöhnlichen und inaktivierten Blutserums in bezug auf das Bakterienwachstum.

Wie in der vorhergehenden Abhandlung eingehend erörtert wurde, befinden sich im inaktivierten Serum Stoffe, welche dessen Oberflächenspannung erheblich vermindern. Es wird danach verständlich, weshalb inaktiviertes Serum im

allgemeinen das Bakterienwachstum weit weniger beeinträchtigt, als die gewöhnlichen Sera.

Die Oberflächenspannung von den Seris verschiedener Tierarten unterscheidet sich, soweit die bisherigen Versuche reichen, nur wenig.[1]) Doch scheinen bestimmte Unterschiede bei manchen Tiergattungen vorhanden zu sein, und jedenfalls kann man sich nach dem, was im letzten Teile der vorhergehenden Abhandlung gesagt wurde, nicht wundern, wenn selbst kleine, kaum meßbare Oberflächenspannungsdifferenzen große unterschiedliche Wirkungen auf Bakterien ausüben.

Die hier entwickelten theoretischen Ansichten sind einstweilen vorwiegend hypothetischer Natur. Die Prüfung dieser Hypothese bietet eber nach allen Seiten experimentelle Angriffspunkte. Ich selbst, der ich auf dem Gebiete der Bakteriologie nicht zu Hause bin, weiß nicht, ob ich durch geeignete Mitarbeiter in den Stand gesetzt werde, an dem hier abgesteckten vielseitigen Programme mitzuarbeiten.[2]) Die Arbeit selbst erscheint mir indessen um so lohnender, als alle bisherigen Hypothesen über die wichtige Virulenzfrage sich als nicht ausreichend erwiesen haben.

[1]) Versuche darüber sind im Gange.

[2]) Ich würde gern hierzu bereit sein.

Das rote Blutkörperchen und sein Inhalt.

Von

J. Traube und Dr. Clara Goldenthal.

(Eingegangen am 6. Mai 1908.)

Durch theoretische Erwägungen kinetischer Art wurden wir zu der Vermutung geführt, daß der Inhalt der roten Blutkörperchen selbst, insbesondere das Hämoglobin ein hämolytisches Agens sein müsse.

Unsere Erwartungen bestätigten sich. Wir verfuhren zunächst so, daß wir uns aus dem defibrinierten Blute getöteter Tiere eine Aufschwemmung 3 mal gewaschener und zentrifugierter $5\,^0/_0$iger Blutkörperchen herstellten. Ferner wurden mit Hilfe von gleichen Teilen destillierten Wassers und alsdann doppeltphysiologischer Kochsalzlösung verschieden starke Lösungen des hämoglobinhaltigen Zellinhalts dargestellt, und diese Lösungen wurden sodann unter veränderten Mengenverhältnissen mit den Blutkörperchen zusammengebracht.

Ein Vergleich mit Kontrollösungen, in denen die Hämoglobinlösung durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt war, ergab dann, daß die Hämolyse in den hämoglobinhaltigen Lösungen weitaus schneller vor sich ging als die „Autolyse" in den Kontrollösungen.

Bei wachsendem Hämoglobinzusatz nahm die hämolytische Wirkung meist in entsprechenden Verhältnissen zu, indessen wäre es möglich, daß hier gewisse Optima der Wirkung bestehen.

Ein Zusatz von Serum verlangsamt die hämolytische Reaktionsgeschwindigkeit, ein Ergebnis, welches ja auch nicht weiter auffallend ist.

Daß tatsächlich das Hämoglobin die wirksame oder jedenfalls die wirksamste hämolytische Substanz unter den Stoffen

ist, welche den Zellinhalt bilden, haben wir durch die liebenswürdige Bereitwilligkeit des Herrn Geheimrat E. Salkowski in Berlin entscheiden können, welchem wir für die Überlassung frisch dargestellten Hundehämoglobins zu großem Danke verpflichtet sind.

Die wässerigen Lösungen diese Hundehämoglobins führten eine etwa ebenso schnelle Hämolyse herbei, wie — in bezug auf den Hämoglobingehalt — etwa gleich konzentrierte Lösungen des Zellinhalts.

Wir bemerken, daß da, wo es erforderlich schien, quantitativ vergleichende Untersuchungen mit Hilfe von Reichls Colorimeter ausgeführt wurden. Meist konnte indessen davon abgesehen werden, nachdem wir uns überzeugt hatten, daß im allgemeinen der Hämoglobingehalt bei verschiedenen Tieren, namentlich derselben Spezies, in ziemlich engen Grenzen schwankt und nachdem wir ferner sahen, daß weitere Ergebnisse dieser Arbeit, auf welche wir sogleich eingehen werden, von geringeren Schwankungen der Quantitätsunterschiede nur wenig beeinflußt wurden.

Als dagegen erkannt wurde, daß die Resistenz roter Blutkörperchen nicht nur bei Tieren verschiedener Spezies, sondern auch bei Tieren derselben Art innerhalb sehr weiter Grenzen schwankte, schien es uns wichtig, an einem größeren Materiale vergleichende Untersuchungen in der Weise anzustellen, daß wir stets unter annähernd gleichartigen Bedingungen arbeiteten.

Es wurden aus verschiedenen Bluten derselben oder verschiedener Tierspezies 5%ige Blutkörperchenaufschwemmungen und 10%ige Hämoglobinlösungen hergestellt.

Nunmehr wurden je 2 ccm jeder Blutkörperchenaufschwemmung mit 2 ccm jeden Hämoglobins versetzt; dazu kamen entsprechende Kontrollösungen, welche anstatt des Hämoglobins nur Kochsalz enthielten, so daß bei einem Vergleiche von z. B. 4 Bluten 20 verschiedene Suspensionen miteinander verglichen wurden. Nach anfänglichem Erwärmen auf 37° haben wir es später vorgezogen, nur bei Zimmertemperatur stehen zu lassen; und es wurde nun der Fortgang der Reaktion bis zur völligen Klärung beobachtet, mit und ohne Hilfe des Reichlschen Colorimeters.

Wir sehen von einer Veröffentlichung unserer umfassenden Einzelbeobachtungen, die mit nahezu 100 Blutarten angestellt wurden, ab, und werden w. u. nur die Ergebnisse in einer Tabelle zusammenfassen. In Zwischenräumen von mehreren Stunden wurde der Fortgang der Hämolyse beobachtet, und dabei zeigte sich zunächst, daß die hämoglobinhaltigen Lösungen weit schneller geklärt wurden als die Kontrollösungen, daß ferner die Resistenz der Blutkörperchen und die Wirksamkeit des Hämoglobins innerhalb weiter Grenzen schwankte. Während zuweilen — aber selten — die vollständige Klärung unter obigen Versuchsbedingungen bereits nach wenigen Stunden erfolgte, gebrauchten die meisten hämoglobinhaltigen Suspensionen zur völligen Hämolyse eine Zeitdauer von 24 bis 48 Stunden, während die Autolyse der entsprechenden Kontrollösungen wesentlich langsamer verlief. Bemerkenswert war nun, daß die Reihenfolge in bezug auf die Klärung der Kontrollösungen in den weitaus meisten Fällen die gleiche war, wie bei den übrigen Lösungen. Hieraus folgerten wir, daß die Autolyse der roten Blutkörperchen auch nur auf die Wirkung des zunächst aus den wenigst resistenten Stellen frei gewordenen Hämoglobins zurückzuführen ist.

Das wichtigste Ergebnis obiger Versuche ist aber unzweifelhaft; die Feststellung, daß die Reihenfolge, welche sich für die Wirksamkeit ein und desselben Hämoglobins auf verschiedene Blutkörperchenaufschwemmungen ergibt, dieselbe ist, wie diejenige, welche sich für die Wirksamkeit der aus diesen verschiedenen Blutkörperchen gewonnenen Hämoglobine auf ein und dieselben Blutkörperchen ergibt.

Je weniger resistent eine rote Blutzelle ist, um so größere hämolytische Kraft hat ihr Inhalt.

Der Gedanke, daß hier Quantitätsunterschiede den Ausschlag geben, konnte, wie erwähnt, durch besondere Versuche mit Hilfe von Reichls Colorimeter leicht widerlegt werden, und es bleibt nichts anderes übrig, als irgendwelche Qualitätsunterschiede der Wirkung anzunehmen.

Jenes Gesetz erschien uns hinreichend beachtenswert, um es an einem größeren Material in der besprochenen Weise zu prüfen.

Wir fassen das Ergebnis unserer Versuche an Tieren aus

dem Schlachthause und einer Anzahl kranker Tiere (vgl. w. u.) in folgender Tabelle zusammen:

Blutkörperchenresistenz.	Hämolysierende Kraft des Hämoglobins.
1. Rind < Hammel.	Rind > Hammel.
2. Rind < Hammel.	Rind > Hammel.
3. 4 Schweine I < II II = III III < IV.	I > II II = III III > IV.
4. 4 Rinder II < IV < I I = III.	II > IV > I I = III.
5. 3 Hammel III < I < II.	III > I > II.
6. Rind < Stier < Kalb I < Kalb II.	Rind > Stier > Kalb I > Kalb II.
7. Rind II < I < III < Kalb I = II = III.	Rind I > II > III > Kalb I > II > III.
8. RindII < KalbI < Rind I < KalbII.	Rind I > II > Kalb I > II.
9. Rind I < Kalb II < Kalb I < Rind II.	Rind II > Kalb II > Kalb I > Rind I.
10. Schwein < Rind < Hammel < Pferd.	Schwein > Rind > Hammel > Pferd.
11. Schwein < Hammel < Pferd < Rind.	Schwein > Hammel > Pferd > Rind.
12. Pferd II < Ratte < Kaninchen I = II < Pferd I.	Pferd II > Kaninchen I > II > Pferd I > Ratte.
13. Schwein < Rind < Hammel < Pferd.	Schwein > Rind > Hammel > Pferd.
14. Schwein < Hammel = Rind < Pferd.	Hammel > Rind > Schwein > Pferd.
15. Hammel < Rind < Schwein.	Rind > Schwein > Hammel.
16. Hammel < Rind < Schwein.	Rind > Hammel > Schwein.
17. Hämoglobinäminrind < Brustseuchepferd < normales Pferd < anämisches Pferd.	(Hämoglobieämie) Rind > normal. Pferd > anäm. Pferd = Brustseuchepferd.
18. Anämiepferd < normales Pferd < Brustseuchepferd.	Anämiepferd > Brustseuchepferd = normales Pferd.
19. Naganapferd < Brustseuchepferd < normales Pferd.	Naganapferd > Brustseuchepferd > normales Pferd.
20. Brustseuchepferd < normal. Pferd < anämisches Pferd.	Brustseuchepferd > normal. Pferd > anämisches Pferd.
Schweinepestpferd < Naganapferd < normales Pferd.	Schweinepestpferd > Naganapferd > normales Pferd.
Hämoglobinurierind < Brustfellentzündungspferd < normales Pferd.	Hämoglobinurierind > Brustfellentzündungspferd > normales Pferd.
Normales Pferd < Brustseuchepferd < anämisches Pferd < Schweinepestpferd.	Normales Pferd > Brustseuchepferd > anämisches Pferd > Schweinepestpferd.
Normales Pferd < Brustfellentzündungspferd I < II.	Normales Pferd > Brustfellentzündungspferd I > II.

Wir sehen, daß das Gesetz sich in den weitaus meisten Fällen bestätigt. Wie weit die Abweichungen mit Quantitätsunterschieden zusammenhängen, wurde nicht in allen Fällen entschieden.

Vielleicht verdient die sich auf die Untersuchung von insgesamt 12 Kälbern und ebensoviel Rindern erstreckende Feststellung Erwähnung, daß in der Mehrzahl der Fälle die Resistenz der Kälberblutkörperchen größer war als diejenige der Blutkörperchen vom Rinde.

Die Erkenntnis, daß die Hämoglobine blutkörperchenzerstörende Eigenschaften haben, verdient vom Standpunkte der Pathologie aus Beachtung. Bei der Hämoglobinämie und sonstigen Bluterkrankungen, die zu anämischen Zuständen führen, ist jener Tatsache, die übrigens bereits vermutet wurde, Beachtung zu schenken.

Dank der großen Liebenswürdigkeit der Herren Dr. Pfeiler und Dr. Hempel und des Institutsvorstandes Herrn Dr. Knuth von der Tierärztlichen Hochschule in Berlin wurden wir in den Stand gesetzt, das bereits in der obigen Zusammenstellung mitberücksichtigte Material von Pferden, welche an Anämie, Brustseuche, Brustfellentzündung, Nagana und Schweinepest litten, sowie eine Kuh zu untersuchen, welche noch die Folgen der Hämoglobinämie nicht überwunden hatte.

Leider führten die Versuche nicht zu so durchsichtigen Ergebnissen, wie wir gewünscht hätten. Als Mittelwert der Resistenz der Blutkörperchen, berechnet aus der Zeitdauer bis zur vollständigen Hämolyse fanden wir für 8 normale Pferde = 46 Stunden, während die Mittelwerte für verschiedene Krankheiten, wie Nagana, Schweinepest und Hämoglobinämie, wesentlich geringer waren, 26, 30 und 28 Stunden. Bei einem Falle von Schweinepest erfolgte schon die vollständige Hämolyse in 4 Stunden, und ebenso erwies sich die Resistenz der Blutkörperchen bei der nach dieser Richtung besonders interessanten Hämoglobinämie als sehr gering, und dementsprechend die hämolytische Kraft des betreffenden Blutkörpercheninhaltes als sehr groß.

Herr Dr. Knuth machte uns darauf aufmerksam, daß nach seinen Beobachtungen diejenigen an Texasfieber erkrankten Tiere am ehesten gesundeten, bei welchen eine reichliche Hämo-

globinausscheidung durch die Nieren erfolgte. Es gelangten auch fünf Fälle von ansteckender Anämie zur Untersuchung. Die mittlere Resistenz der Blutkörperchen war aber sehr erheblich = 42 Stunden, woraus wohl geschlossen werden darf, daß die Krankheitsursache nichts mit den Wirkungen der Hämoglobine zu tun hat.

Am Schlusse dieser Betrachtungen möchten wir die Frage aufwerfen, inwieweit sich die hier gemachten Erfahrungen an roten Blutkörperchen etwa verallgemeinern und auf andere Zellen und Zellsysteme ausdehnen lassen. Man denkt unwillkürlich an die zahlreichen „autolytischen" Vorgänge sowie an die jedem Pathologen bekannte Tatsache, daß geschädigte Zellen Giftwirkungen besitzen.

Wird durch ein Toxin oder ein sonstiges Agens eine Zelle und dessen Inhalt in spezifischer Weise verändert, so bedarf es zur weiteren Fortwucherung der Erkrankung weder eines Infektionserregers noch der weiteren Gegenwart des nur als Katalysator wirksamen Toxins, sondern wenn das, was hier für die Blutkörperchen gefunden wurde, verallgemeinert werden darf, so würde nun der spezifisch veränderte Zellinhalt auf Grund des genannten Gesetzes weiterwirken und nach einer gewissen charakteristischen Inkubationszeit würde die Wirkung des katalysierenden Toxins und der krankhaft veränderten Zellinhalte sich geltend machen.

Wir müssen den Pathologen die Entscheidung überlassen, inwieweit sie diese Verallgemeinerung unserer Versuchsergebnisse sowie diese Hypothese über die Wirksamkeit von Toxinen und die Inkubationszeit gelten lassen wollen. Wir verweisen diesbezüglich auf die Ausgangsbetrachtungen der folgenden Mitteilung.

Zur Spezifizitätsfrage.

Von

J. Traube.

(Eingegangen am 6. Mai 1908.)

Mit 1 Figur im Text.

Der Begriff der Tautomerie darf wohl als bekannt vorausgesetzt werden. Ein jeder Chemiker weiß, daß die Gegenwart gewisser Gruppen in dem Moleküle einer organischen Verbindung zu einer höchst labilen Klasse von Isomerieerscheinungen Veranlassung gibt, einer Labilität, welche so groß sein kann, daß die Trennung der tautomeren Formen den größten Schwierigkeiten begegnet und die kleinste Änderung des Milieus, beispielsweise des Lösungsmittels erhebliche Änderungen des etwa vorhandenen Gleichgewichtszustandes hervorzurufen imstande ist. Ich sage auch gewiß nichts Neues, wenn ich auf die große biologische Bedeutung dieses Tautomeriegebietes hinweise, denn es ist allgemein bekannt, daß das Eiweißmolekül eine große Anzahl derartiger tautomerer Umwandlungen fähiger Gruppen enthält, und wenn wir von der außerordentlichen Labilität der Eiweißstoffe hören, wenn wir erfahren, daß beispielsweise dasselbe Eiweiß in einem alkalischen Milieu sich verschieden verhält von demjenigen in saurer Umgebung, so ist es gewiß naheliegend, daß wir dieses abweichende Verhalten mit tautomeren Umwandlungen in ursächlichen Zusammenhang bringen.

Was aber ein Alkaliteilchen zustande bringt, das wird sicherlich auch zuweilen ein Toxinteilchen vermögen, und wir bewegen uns gewiß nicht auf schwankendem Boden, wenn wir die Annahme machen, daß viele Toxine das Protoplasma in bestimmter Weise zu verändern vermögen. Diese Veränderung einer Eiweißmoleküls seitens eines Toxinteilchens muß aber spezifisch sein.

Wir wollen einmal die vereinfachte Annahme machen, ein Eiweißmolekül hätte insgesamt nur 10 tautomere Gruppen (in Wahrheit ist die Zahl natürlich weitaus größer), welche teilweise verschieden sind, dann kann dieses Eiweißmolekül unter dem Einflusse von Katalysatoren etliche hundert tautomerer Formen annehmen. Man erkennt, wie groß die Zahl der Rezeptoren ist, welche durch die Gegenwart verschiedener Toxine gebildet werden.

Ist aber etwa unter dem Einflusse eines Toxins ein solcher Rezeptor gebildet, der natürlich auch ein Spaltungsprodukt des Eiweißes sein kann, so wird nach den Lehren der Gleichgewichtslehre und der Massenwirkung die Bildung dieses einen Rezeptors die Bildung weiterer Rezeptoren gleicher Art zur Folge haben. Das Weigertsche Gesetz ergibt sich als eine Folgerung der Mechanochemie,[1]) und wir brauchen hier nicht einmal an die Krystalle der stabilen Modifikation zu erinnern, welche man in die Schmelze der labilen Modifikation desselben Stoffes hineinwirft. Auch wenn die Stabilität des Rezeptors unter den gegebenen Umständen nicht größer wäre, als diejenige seiner Muttersubstanz, müßte die Rezeptorenbildung weiter fortschreiten, gleichgültig, ob das katalysatorisch wirkende Toxinteilchen noch vorhanden ist oder nicht.[2]) Die Deutung der Inkubationszeit[3]) ergibt sich hiernach von selbst.

[1]) Siehe meinen Grundr. d. physikal. Chem. Stuttgart 1904.

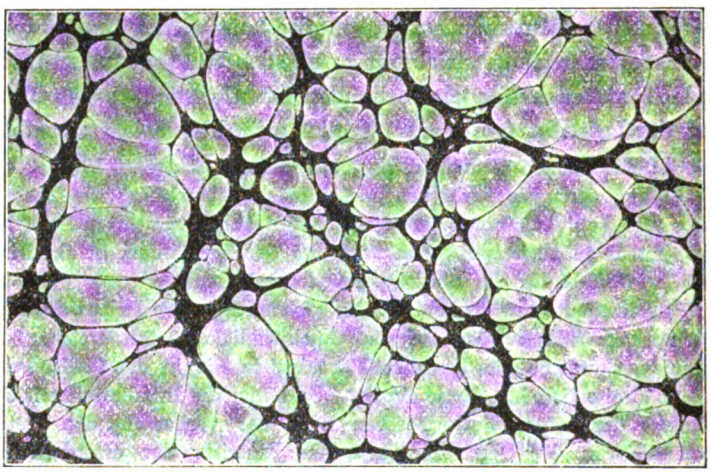
[2]) Vgl. auch die vorhergehende Arbeit, insbesondere die Schlußsätze. Der Zellinhalt einer durch ein Toxinteilchen zerstörten Zelle bewirkt danach möglicherweise den Fortgang der Zerstörung, in ähnlicher Weise, wie dieses für die Blutkörperchen gezeigt wurde.

[3]) Ich könnte mir denken, daß in vielen Fällen die Inkubationszeit zurückzuführen wäre auf die Geschwindigkeit, mit welcher die Toxinmenge, welche die Krankheit auslöst, in die in den Zellen vorhandene zweite lipoide Phase eintritt. So hängt die Inkubationszeit der Hämolyse der roten Blutkörperchen nach der vorhergehenden ersten Arbeit ab von der Geschwindigkeit des Eintritts der erforderlichen Hämolysinmenge in die lipoide Phase; die Inkubationszeit der narkotischen Wirkung ist auf dieselbe Ursache zurückzuführen (siehe meine Abb. l. c. in Pflügers Archiv). Aber im allgemeinen genügt die Annahme, daß die Inkubationszeit bestimmt ist durch die Geschwindigkeit, mit welcher der durch den Katalysator (Toxin, Zellgift, Strahlenwirkung) eingeleitete chemische oder physikalische Vorgang (siehe w. u.) fortschreitet und eine Schwellenwertkonzentration erreicht.

Die Inkubationszeit, sowie der Verlauf der Krankheiten stehen offenbar mit der Dynamik des chemischen Vorganges, sowie der Art und Menge des Katalysators in engstem Zusammenhange.

Es wird hiernach verständlich, daß verschiedene Toxine in Anbetracht der außerordentlichen Umwandlung des Eiweißmoleküls spezifisch zusammengesetzte Rezeptoren erzeugen; spezifische Rezeptoren in beliebiger Menge, vorausgesetzt, daß der Tautomerisationsprozeß, welcher an Ort und Stelle verläuft, nicht zu einer Erkrankung führt, derart, daß sie dem Organismus keine Zeit mehr läßt, genügende Rezeptoren in den Kreislauf des Blutes zu entsenden.

Wir verstehen die Bildung spezifisch zusammengesetzter Rezeptoren, aber wir verstehen nicht, weshalb die so gebildeten Rezeptoren spezifisch wirken, d. h. sich im allgemeinen nur mit denjenigen Toxinteilchen physikalisch oder chemisch zu verbinden vermögen, welche zu ihrer Entstehung Veranlassung gegeben haben.



Zeichnung nach Versuch von J. Traube.

Das wichtigste Problem ist somit noch ungelöst; um seiner Lösung näher zu kommen, wolllen wir einmal das Problem von einer ganz anderen Seite aus betrachten.

Die anbei befindliche Zeichnung zeigt uns ein sogenanntes

„Tunkpapier", (Buntdruckpapier) hergestellt nach einer sehr alten Technik. Auf einem höchst dickflüssigen gallertigen Pflanzenschleimboden werden Farbstofftröpfchen aufgetropft, denen etwas Galle und ähnliche die Oberflächenspannung vermindernde Stoffe zugesetzt werden.

Durch diese Zusätze wird bewirkt, daß die Tropfen niemals bis zur Berührung zusammentreten, und zusammenfließen, also etwa chemisch oder physikalisch miteinander reagieren können.

Der Übergang von diesem Tunkpapier zum Blute ist nicht so gewaltsam, wie derselbe im ersten Augenblick erscheinen könnte. Auch das normale Blut ist ein mehrphasiges System, in welchem u. a. Kolloidteilchen von geringem Haftdrucke, Lipoide und lipoidhaltige Zellen in größter Menge suspendiert sind. Blutkörperchen haben die Fähigkeit, unter bestimmten Umständen zu agglutinieren, Kolloide die Fähigkeit, sich zusammenzuballen und ausflocken zu lassen. Beides geschieht nicht in normalem Blute; die Annahme liegt nahe genug, daß hier Kräfte vorhanden sind,[1]) Oberflächenkräfte, welche einem Zusammentritt der Kolloidteilchen zu größeren Komplexen, einer Vereinigung der Zellen zu Zellkomplexen sich ebenso widersetzen, wie dies bei den gallehaltigen Tropfen der Fall ist. In beiden Fällen haben wir es mit Systemen zu tun, bei welchen Stoffe mit geringem Haftdrucke mit einem wässerigen Milieu in Berührung sind.

Handelt es sich hier um ein Gleichgewichtssystem wie das normale Blut, so berechtigt uns das stabile Verhalten dieses Systems zu der Annahme, daß von den verschiedenen Phasen, welche in diesem heterogenen Systeme verteilt sind, Kraftlinien ausgehen, derart, daß die verschiedenen Teilchen sich möglicherweise bis auf minimalste Bruchteile eines Millimeters nahekommen können, immer aber bleibt ein solcher Abstand gewahrt, daß die Möglichkeit physikalischer oder chemischer

---

[1]) Die Alkalität des Blutes dürfte nach dieser Richtung von großer Bedeutung sein; bekanntlich befördern kleinste Alkalimengen in hohem Maße die Stabilität der Emulsionen. Nach eigenen Versuchen bewirkte ein Zusatz von 0,1 % Diäthylamin zu einem Gemische von Olivenöl und Wasser die Bildung einer durchaus haltbaren Emulsion.

Reaktionen, beispielsweise Ausflockungen oder Agglutinationen usw., unter normalen Verhältnissen ausgeschlossen ist.

Wir bringen nunmehr in dieses Milieu etwa ein Blutkörperchen einer fremden Spezies. Dieser Störenfried paßt wegen seiner physikalischen Oberflächenbeschaffenheit nicht in das Milieu. Die Kraftlinienzahl, welche von seiner Oberfläche ausgeht, ist offenbar eine andere, als die der im Blute befindlichen Blutkörperchen. Der Eindringling stört das Spiel der Teilchen,[1]) er wird angegriffen von zahlreichen Feinden und geht, wie die Erfahrung lehrt, schließlich zugrunde. Aber nun rächt er sich, seine Produkte gelangen ins Blut; diese Produkte sind nicht wesensidentisch, zum mindesten im physikalischen Sinne mit den Produkten, welche die arteigenen Blutkörperchen beherbergen. (Vgl. u. a. die vorhergehende Abhandlung.)

Diese Produkte bewirken dort, wohin sie durch den Kreislauf des Blutes gelangen, tiefgreifende Änderungen, die zu spezifischen Wirkungen Veranlassung geben. Wie mögen nun diese katalysatorisch wirkenden Bestandteile der fremden Blutart solche Änderungen hervorbringen können?

Fügen wir einer Kolloidlösung eine gewisse Salzmenge hinzu, so bewirken die kleinen Magnete, welche wir einführen, daß die Kolloidteilchen sich sichtbar oder (ohne Ultramikroskop) unsichtbar zusammenballen; fügen wir gewissen Bakterien oder Blutzellen gewisse Stoffe hinzu, so vermögen wir die gleiche Erscheinung in Form einer Agglutination hervorzurufen. Auch Tropfen auf einem Pflanzenschleimboden können wir erzeugen, die unter gewöhnlichen Umständen sich abstoßen, aber durch die Wirkung eines dritten Tropfens aus anderer Substanz in mannigfaltigster Weise zur Vereinigung gebracht werden können. Es gibt also magnetisch wirkende Stoffe, welche die Oberflächenspannungen an der Grenze von Phasen von geringem Haftdrucke gegenüber dem Wasser so ändern, daß eine Berührung und damit die Bedingung zu einer physikalischen oder chemischen Reaktion ermöglicht wird, und wenn man u. a. an die Erzeugung der Präzipitine und der Agglutinine denkt, so

---

[1]) Vgl. u. a. hierher gehörende Beobachtungen von Quinke, Wied. Ann. Phys. 35, 580, 1888 und Verh. Heidelb. Naturheil. Med. Wissensch. 104, N. F. VII.

wird man sich die Wirkung eines fremden Blutkörperchens, bzw. dessen Bestandteile so denken können, daß dieser Störenfried da, wohin er gelangt, oder dort, wo seine Bestandteile sich festsetzen, innerhalb oder außerhalb einer Zelle, in erster Linie physikalische Änderungen des Gleichgewichts herbeiführt derart, daß das Spiel der beweglichen Moleküle Komplexbildungen hervorbringt, welche so in bezug auf die Oberflächenkräfte abgestimmt sind, daß sie imstande sind, sich vorübergehend oder dauernd mit dem Katalysator oder auch unter sich zu vereinigen.

Die Hypothese, welche wir hier einführen, besteht somit in der Annahme, daß Stoffe von geringem Haftdrucke, und fremde Phasen, welche in Wasser suspendiert sind, unter gewöhnlichen Umständen auf Grund der an der Oberfläche wirksamen Kräfte nicht zur Berührung gebracht werden können, daß dies aber möglich ist unter dem Einflusse von Katalysatoren (fremde Blutkörperchen, Toxinen usw.), welche nun ihrerseits auch in spezifischer Weise befähigt werden, mit den gebildeten Komplexen in Reaktion zu treten. Die Annahme solcher abgestimmten Moleküle und Phasen, von denen eine solche Anzahl Kraftlinien ausgehen, daß eine Vereinigung möglich wird, erscheint mir nicht merkwürdiger, als die Annahme abgestimmter Wellen im Markoniapparate oder abgestimmter Stimmgabeln. Wenn ein Ferment in einem gegebenen Falle wirksam ist im Gegensatze zu 100 anderen Fermenten, welche hier versagen, um in anderen Fällen zu wirken,[1]) so ist es hiernach nicht erforderlich, daß nun alle

[1]) Interessant ist vom Standpunkte der hier entwickelten Ansichten aus die Theorie von Barendrecht (Zeitschr. f. physikal. Chem. 49, 456, 1904), welcher die Fermentwirkungen als strahlenartige Wirkungen auffaßt. Was Barendrecht Strahlen nennt, nenne ich: Kraftlinien.

Die zahllosen Fermente sind nach meinen Ansichten vielfach nur verschiedenartige Aggregate derselben Materie mit verschiedener Oberflächenspannung. Ganz wie die Stimmgabel nur bei bestimmter Tonhöhe mitschwingt, findet auch hier eine Resonanz der Moleküle statt, wenn die Kraftlinien entsprechend abgestimmt sind. Es wird verständlich, daß zahlreiche Fälle beobachtet wurden, bei denen das Milieu die Wirkung des Ferments beeinflußt, ändert oder aufhebt.

diese Fermente chemisch verschieden konstituiert sein müssen; es genügt die viel einfachere Annahme, daß es im allgemeinen nur Aggregate derselben Materien sind, nur mit dem Unterschiede, daß die Oberflächenkräfte verschieden wirken. Wir könnten somit auch bei der Bildung der Rezeptoren von den am Eingang dieser Abhandlung erwähnten tautomeren Umwandlungen absehen, doch meine ich, daß in vielen Fällen der Katalysator auch chemische Änderungen neben den physikalischen Molekülverschiebungen herbeiführen wird.

Im engsten Zusammenhange mit diesen Betrachtungen erscheint mir ein nahverwandtes Gebiet von Erscheinungen zu stehen. Wenn wir ein Kolloid mittelst eines Salzes fällen, so zeigen sich Konzentrations-Optima der Wirkung. Derartige Optima sind vielfach auch bei anderen verwandten Erscheinungen beobachtet. So zeigt sich beispielsweise, daß die Fällung elektro-positiver durch elektro-negative Kolloide oft auf enge mittlere Konzentrationsgrenzen beschränkt ist. Diese Tatsachen — diese Spezifitäten der Konzentrationen — sind bisher nicht genügend erklärt;[1]) wie mir scheint, sprechen aber auch diese Erscheinungen dafür, daß nur bei ganz bestimmter Verteilung der Oberflächenkräfte die Kolloidteilchen so zusammentreten können, daß eine gegenseitige Adsorption oder Verbindung, bzw. Ausfällung erfolgen kann.

Ob durch die in dieser Arbeit mitgeteilte Hypothese das

Das Ferment ist im allgemeinen kein Katalysator, welcher eine Reaktion nur beschleunigt, sondern ein Katalysator, welcher solche Bedingungen schafft, daß die Reaktion stattfinden kann, welcher also die Reaktion auslöst.

Die Katalysatorentheorie Ostwalds erleidet also auch hier, bei den Wirkungen von Fermenten, Antigenen usw., wie auch in anderer Beziehung (vgl. meine Abhandlungen in Pflügers Archiv) in der Biologie vollständigen Schiffbruch.

[1]) Ein Erklärungsversuch liegt vor von Billitzer (vgl. Zeitschr. physikal. Chem. 51, 140 u. 158, 1905. Billitzer nimmt an, daß die Fällung am vollständigsten ist, wenn das Mengenverhältnis der einzelnen Kolloide in der Mischung im umgekehrten Verhältnis der elektrischen Ladungen steht, welche die einzelnen Kolloide tragen sollen. Billitzer nimmt als eine — Abstimmung der elektrischen Ladungen — an, ich spreche allgemeiner von Kraftlinien oder auch Oberflächenkräften, möchte mich indessen nicht auf elektrische Kräfte festlegen. Man sieht aber, daß hier eine Verwandschaft der Meinungen besteht!

wichtige Spezifizitätsproblem seiner Lösung näher gebracht ist, möchte ich nicht zu entscheiden wagen. Ich bin mir nicht einmal sicher, ob meine Hypothese das leistet, was eigentlich eine gute Hypothese in erster Linie leisten soll, nämlich der fortschreitenden Wissenschaft neue Wege weist. Wenn ich mich aber trotzdem entschlossen habe zu dieser Veröffentlichung, so leitete mich der Gedanke, daß diese Hypothese an Einfachheit die bisherigen Hypothesen übertrifft und nicht Vorstellungen verlangt über wunderbar erscheinende Kräfte im Organismus, welche dem Neo-Vitalismus neue Anhänger zuführen müssen.

Kein teleologisches Moment ist in meiner Hypothese enthalten; nicht zahllose, chemisch verschiedene Specifica, die bei jeder Tierspezies, beispielsweise bei jeder Schlange verschieden sind, sind vorhanden, sondern es handelt sich um verschiedene Kombinationen derselben Bausteine. Die verschiedenen Arten der Organismen sind nicht so grundverschieden, wie dies nach den herrschenden Ansichten der Fall sein würde, und doch versteht man es, daß nur unter außergewöhnlichen Umständen eine Überbrückung der Kluft, welche die verschiedenen Arten voneinander scheidet, ermöglicht wird.

Über das Phaeophytin und die Chlorophyllane nebst Schlußbemerkungen über das Phylloxanthin.

Von

M. Tswett.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Warschau.)

(Eingegangen am 12. Mai 1908.)

Die Filholsche Reaktion und Willstätters Phaeophytin.

Es ist eine längst bekannte Tatsache, daß alkoholische Chlorophyllösungen, wenn mit kleinen Mengen organischer Säuren oder Salzsäure versetzt, einen dunkel gefärbten Niederschlag liefern, welcher den zersetzten fluorescierenden Anteil (Chlorophylline α und β) des Chlorophyllpigmentes darstellt. Der erste, welcher diese Reaktion beobachtete, war Filhol[1]) (1865), nämlich beim Zusatz von Oxalsäure, Essigsäure, Weinsäure, Citronensäure oder Salzsäure. Quantitative Angaben über die Mengen der in wässeriger Lösung zugesetzten Säuren wurden nicht mitgeteilt und auch die Alkoholkonzentration der verwendeten Chlorophyllösungen (aus Algen, Moosen, Farnkräutern, Mono- und Dikotylen) wurde nicht angegeben. Nach Zugießen der Oxalsäurelösung, berichtet Filhol, nimmt die Chlorophylltinktur eine braungelbe Färbung an und es bilden sich nach einiger Zeit schwarze Flocken, welche auf dem Filter zurückbleiben, während das Filtrat gelb abläuft und kein „Dichroismus" (Fluorescenz) mehr aufweist. Chlorophyllösungen aus Dikotylen liefern eine amorphe Ausfällung, während bei Monokotylen dieselbe krystallinisch ist (sternförmige Nadelschuppen). Die Substanz ist in siedendem Alkohol (85 %) leicht löslich, schwer

[1]) Filhol, E., Compt. rend. **61**, 371, 1865; **66**, 1218 1868; **79**, 612, 1874, Annal. d. Chem. et d. Physiol. IV, **14**, 332, 1868.

aber im kaltem. Konzentrierte Salz- und Schwefelsäure lösen mit grüner Farbe, ohne Fluorescenz, wobei eine fettartige Verunreinigung hinterbleibt. Essigsäure gibt eine fluorescierende, violettgefärbte Lösung, die beim Zusatz von Kupfer- oder Zinkacetat schön grün wird. Die Substanz ist sehr stickstoffreich.

Filhols Versuche wurden von Gerland und Rauwenhoff[1]) wiederholt, welche den Niederschlag (in Alkohol aufgelöst) sowie das gelbe Filtrat spektroskopisch untersuchten. Dieses erwies sich ohne Adsorptionsbänder in der linken Spektrumhälfte.

Für jenen habe ich aus Gerlands und Rauwenhoffs Zeichnung (Tafel II, Figur 6, Ordinate 50) folgendes Absorptionsspektrum berechnet[2]) und mit demjenigen des Hoppe-Seylerschen Chlorophyllans (nach Tschirch[3]), Wegscheider[4]) und Bode[5])) zusammengestellt (λ in zehnfachen Angströmseinheiten).

Bänder	Filhols Niederschlag nach Gerland u. Rauwenhoff	Chlorophyllan nach Tschirch	Chlorophyllan nach Wegscheider	Chlorophyllan nach Bode
I	685—648	680—640	683—643	685—646
II	613—595	620—590	619—598	620—595
III	566—555	570—560	575—555	572—560
IV	547—533	550—530	546—527	545—530
V	518—500	513—490	520—490	517—495
VI (Endabsorption)	von 475 ab	470—	476—	3 (Xanthophyll-) Bänder
Intensitätsskala	I〉IV〉V〉II〉III	I〉IV〉V〉II〉III	I〉IV〉V〉II〉III	I〉IV〉II〉V〉III

Wie ersichtlich, sind die Differenzen zwischen Filhols Niederschlag und Chlorophyllan von derselben Ordnung wie diejenigen zwischen den einzelnen Chlorophyllanpräparaten, und

[1]) Gerland, E., u. Rauwenhoff, N., Pogg. Ann. **143**, 231, 1871.

[2]) Zum Entwurf der Dispersionskurve habe ich die Abzcisse der Linie b fortgelassen, da sie eine Einkerbung der Kurve bewirkt und darum augenscheinlich irrtümlich ist.

[3]) Tschirch, A., Untersuchungen über das Chlorophyll, 52, 1884.

[4]) Wegscheider, R., Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **2**, 494, 1884.

[5]) Bode, G., Untersuchungen über das Chlorophyll, Kassel 1898, 14.

lassen sich durch Verschiedenheit der angewandten „mittleren" Konzentration, Unsicherheiten der subjektiven Beobachtungsmethode, sowie auch durch die Inhomogenität (optische Unreinheit) der Präparate (Xanthophyllfarbstoffbänder nach Bode, Dualität des Chlorophyllans sowie des Filholschen Präparates) erklären.

Hervorzuheben ist noch, daß Gerland und Rauwenhoff die Doppelart des ersten Absorptionsbandes konstatiert haben. Bei der in obiger Tabelle charakterisierten Konzentration weist nämlich Band I zwei ungleich starke Absorptionsmaxima Ia = 685—668 und Ib = 660—655 auf, wobei Ia das dunkelste ist.

Kraus[1]) bestätigte ebenfalls die vollständige Ausfällung des fluorescierenden Anteils des Chlorophylls mittels verschiedener Säuren (Oxal-, Wein-, Citronen-, Apfel-, Salzsäure). Filhols Niederschlag wurde weiter auch von Frank[2]), Wiesner[3]) (krystallinisch) und Tschirch[4]) erhalten, welcher die ausgefällte Substanz, gleichwohl ob mittels verdünnter Salzsäure oder organischen Säuren dargestellt, als mit Chlorophyllan indentisch betrachtete.

Unabhängig, wie es scheint, von den früheren Forschern hat neuerdings Willstätter[5]) die Wirkung der Oxalsäure auf alkoholische Chlorophyllösungen wiederum entdeckt und den erhaltenen Niederschlag unter Anwendung einer ausgezeichneten Technik in großer Menge (kilogrammweise) dargestellt und nach verschiedenen Seiten untersucht. Der Farbstoff, Phaeophytin genannt, wurde stickstoffhaltig und aschefrei gefunden. In spektroskopischer Hinsicht stimmt er mit dem Hoppe-Seylerschen Chlorophyllan überein, unterscheidet sich aber davon durch seine Aschenlosigkeit und gewisse Löslichkeitsverhältnisse. Diese Umstände könnten jedoch durch die Inhomogenität des Chlorophyllans bedingt werden.

---

[1]) Kraus, G., Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe, 81, 82, 1872.

[2]) Frank, A., Botan. Centralbl., **10**, 1882, 228.

[3]) Wiesner, J., Botan. Centralbl., **10**, 260, 1882.

[4]) Tschirch, A., Untersuchungen über das Chlorophyll, 43, 57, 58, 1884.

[5]) Willstätter, R., u. Hocheder, F., Liebigs Ann. **354**, 205, 1907.

Eigene Untersuchungen über das Phaeophytin.

Nachdem mir zum ersten Male die optische Reindarstellung der Chlorophylline α und β gelang[1]), habe ich im vorigen Jahre auch die nächsten Säurederivate dieser genuinen fluorescierenden Komponenten des Chlorophylls in einigen Beziehungen untersucht[2]), wobei zwei Farbstoffe erhalten wurden, welche ich als Chlorophyllane α und β bezeichnete, indem ich voraussetze, daß Hoppe-Seylers Chlorophyllan hauptsächlich ein Gemisch dieser beiden Derivate war. Gleichzeitig erschien die bahnbrechende chemische Arbeit Willstätters, und es lag mir sehr nahe, meine Chlorophyllane mit dem ebenfalls unter gelinder Einwirkung organischer Säure entstehenden Phaeophytin zu vergleichen.

Die bisher von allen Chemikern ignorierte oder unberücksichtige Dualität des fluorescierenden Anteils des Chlorophylls ließ nämlich vermuten, daß auch der unter Einwirkung der Oxalsäure in Chlorophyllösungen entstehende Niederschlag ein Gemisch der Säurederivate der beiden Chlorophylline darstellt.

Zur Prüfung der Angelegenheit habe ich kleine Mengen von Phaeophytin nach Willstätters Vorschrift dargestellt. Es wurden 3 Rohpräparate hergestellt, zwei aus Taubnesseln (Lamium album) und eins aus Brennesseln (Urtica dioica). Die Blätter wurden zuerst an der Luft und dann im Rouxschen Thermostat bei 40° C ausgetrocknet, in der Reibschale zerkleinert und mit abs. Alkohol zwei Tage lang kalt ausgezogen. Die erhaltenen durchfiltrierten Lösungen wurden mit 0,4 bis 0,5 % Oxalsäure in alkoholischer Lösung versetzt. Nach 1 resp. 4 Tagen (Brennessel) wurde der inzwischen entstandene körnige Niederschlag auf dem Filter gesammelt, wobei das Filtrat noch reich an Chlorophyllinderivaten war.[3])

Der Niederschlag wurde auf dem Filter mit 80 %igen Alkohol mehrmals ausgewaschen, zwischen Filtrierpapier abgepreßt und in zwei Portionen verteilt, deren eine im Schwefelsäure-

---

[1]) Tswett, M., Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 24, 316 u. 384, 1906.

[2]) Tswett, M,, Diese Zeitschr. 5, 6, 1907.

[3]) Entgegengesetztes Resultat, nämlich vollständige Ausfällung der Chlorophyllinen in Filhols, Gerlands und Rauwenhoffs, sowie Kraus' Versuchen beruht wohl darauf, daß die verwendeten Chlorophyllösungen wasserhaltig waren.

Exsikator gebracht wurde, während ich die andere sofort zu Versuchen benutzte.

Die frische Substanz und besonders die vom Exsikator stammende waren im Petroläther fast unlöslich, lösten sich aber ein wenig darin unter Alkoholzusatz (10 %). Äther, Schwefelkohlenstoff und besonders Chloroform lösten mit Leichtigkeit.

Behufs Prüfung des Farbstoffs auf Einheitlichkeit wurde in einem ersten Versuch die frische Substanz in alkoholhaltigem Petroläther aufgenommen, die Lösung vom Alkohol durch Wasser befreit und der chromatographischen Adsorptionsanalyse[1]) unterworfen. Als Adsorbens wurde wie gewöhnlich gefälltes $CaCO_3$ verwendet. Es bildeten sich in der Adsorptionssäule von oben nach unten drei Zonen:

I Farblos,
II Braungelbgrün,
III Stahlgrau.

III Zone erschien 3 bis 4 mächtiger als II. Die I. war die schmälste. Die Calciumcarbonatsäule wurde aus der Adsorptionsröhre herausgeschoben und mittels des Messers die Zonen II und III abgetrennt. Jede für sich wurde dann mit Äther ausgezogen, wobei Adsorbens sich vollständig entfärbte. Die ätherischen Lösungen wurden nun mittelst des Zeißschen Spektralokulares in dem Flögel-Engelmannschen Dunkelkasten[1]) unter Anwendung eines hohen Spektrums[2]) untersucht, wobei die Absorptionsspektren sich als mit denjenigen der Chlorophyllane α und β identisch erwiesen. Alle Bänder waren vorhanden, auch die sehr schwachen und leicht übersehbaren Bänder II. Andererseits gaben die ätherischen Lösungen der beiden Farbstoffe die für die Chlorophyllane charakteristischen Farbenreaktionen[3]) mit Kalilauge und Alkohol, insbesondere die vorübergehende schöne rosarote Färbung des Chlorophyllans β.

Versuche, die ich mit anderen Phaeophytinpräparaten anstellte, ergaben gleiche Resultate; nur soll es hervorgehoben werden, daß die jetzt verwendeten CS_2-Lösungen des Farb-

---

[1]) Tswett, M.. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **25**, 139, 1907.

[2]) Tswett, M., Ibid. S. 140 und diese Zeitschr. **6**, 376, 1907 Fußnote.

[3]) Tswett, M.. Diese Zeitschr. 5, 15, 1907.

stoffes bei der chromatographischen Zerlegung für jede Komponente verdoppelte Adsorptionzonen lieferten.

Der spektroskopischen Untersuchung wurde ebenfalls das unentmischte Phaeophytin unterworfen, wobei auch sehr schwache, von Willstätter und Hocheder nicht geprüfte Konzentrationen (Schichtendicken) herangezogen wurden.

Folgende Tabelle enthält die für eine ätherische Lösung des Rohphaeophytins ermittelten Daten:

	Konzentration					
	x	2x	4x	8x	16x	32x
Band Ia	670—660	670—660	670—645	670—642	675—640	678—632
Band Ib	—	660—650				
Band II	—	—	—	Spur auf 635		
Band III	—	—	—	610—595	610—595	615—592
Band IV	—	—	—	—	565—552	566—552
Band V	—	Spuren	538—529	538—529	539—529	540—529
Band VI	—	—	510—495	510—495	510—495	512—492
Band VII	—	—	—	480—470	480—470	
Band VIII	452—448	452—448				480—
Band IX	440—430	440—430	455—	455—	456—	
Endabsorption	von 420< ab	420—				

Intensitätsskala der Bänder IX > VIII > Ia > Ib > IV > V > III > VII >.

Die Zusammensetzung dieses Spektrums aus denen der Chlorophyllane α und β ist durchsichtig.[1]) Dem Chlorophyllan β gehört Band Ib sowie das Doublett VIII + IX; andere Bänder sind Kombinationsstreifen. Insbesondere entsteht durch Überdeckung der V. Bänder der Chlorophyllane das Band auf 535, welches daher dunkler erscheint als der Streifen 510 bis 495, wie es auch im Spektrum des alten unentmischten „Chlorophyllans" bzw. „modifizierten Chlorophylls" zu beobachten ist. Das kaum verspürbare Absorptionsmaximum auf 635, in dem Schatten, welcher Bänder I und III überbrückt, gehört dem Chlorophyllan α.

Vergleichen wir die obige Tabelle mit den von Willstätter und Hocheder[2]) für das mittels mehrfachen Umscheidens ge-

[1]) Tswett, M., Diese Zeitschr. **5**, 13, 14, 1907.

[2]) Willstätter und Hocheder, Liebigs Ann. **354**, 227, 228, 1907.

reinigte Phaeophytin gegebenen, so herrscht zwischen beiden im großen und ganzen eine befriedigende Übereinstimmung, wobei Bänder I, II, III, IV, V Willstätters meinen Bändern I, III, IV, V und VI entsprechen, während der von Willstätter als bei 478 beginnend verzeichnete Halbschatten meinem VII Streifen entspricht.

Die angeführten Versuche beweisen also, daß das Rohphaeophytin ein Gemisch von zwei Farbstoffen ist, welche augenscheinlich mit den Chlorophyllanen α und β identisch sind. Wie steht es nun mit dem mittels Umscheiden in Chloroform gereinigten Präparat, welches elementare Zusammensetzung nach Willstätters Angaben von derjenigen des Rohpräparates kaum abweicht (loc. cit. S. 226)? Spektroskopisch haben Willstätter und Hocheder die sehr schwachen Konzentrationen, bei welchen die Doppelart des I. Bandes, sowie das für Chlorophyllan β charakteristische Doublett VIII + IX nachweisbar sind, nicht untersucht. Entscheidend ist aber, daß Band IV des gereinigten Phaeophytins früher als das V. zum Vorschein kommt; es kann aber nur im Chlorophyllanengemisch geschehen, weil die entsprechenden Bänder des Chlorophyllans α äquipotent ist.

Marchlewskis Untersuchungen.

Mit dem Phaeophytin hat sich neuerdings auch Marchlewski beschäftigt.[1]) Er hat den Farbstoff nach Willstätters Vorschrift dargestellt und mit dem Sediment verglichen, welches beim Versetzen einer Chlorophyllösung mit verdünnter Salzsäure entsteht. Letzteres Präparat wurde bekanntlich schon von mehreren Forschern erhalten (siehe weiter oben) und besonders von Tschirch[2]) als mit Chlorophyllan Hoppe-Seylers identisch betrachtet.

Beide Präparate wurden von Marchlewski mittels Umscheidung aus Chloroform gereinigt. Zwischen den beiden Präparaten fand Marchlewski kleine spektroskopische Differenzen sowie in dem Salzsäuresediment ein niederes Gehalt von Stickstoff. Beide Präparate gaben die Frémysche Reaktion; sie

[1]) Marchlewski, L., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**, 453, 1908.
[2]) Tschirch, A., loc. cit. S. 47, 57.

verteilten sich im System Äther + konz. Salzsäure zu den sog. Phylloxanthin und Phyllocyanin. Für das Chlorophyllan war übrigens dies schon von Tschirch[1]) beobachtet worden.

Da wir jetzt wissen, daß Phaeophytin ein Gemisch der Chlorophyllanen α und β darstellt, so ist das Auftreten der vermeintlichen „Spaltungsprodukte" selbstverständlich, und daher wird sich die von mir bewiesene Autonomie des „Phylloxanthins" und des „Phyllocyanins" ebensowenig „streichen" lassen (vgl. dazu Marchlewski[2]) wie meine spektroskopischen und geschichtlichen Feststellungen betreffend die genuinen Mutterstoffe, die Chlorophylline des Blattes.[3])

Bekanntlich hatte Marchlewski seinerseits die Lehre aufgestellt, Hoppe-Seylersches Chlorophyllan sei ein Gemisch von Phylloxanthin und Phyllocyanin (der vermeintlichen Spaltungsprodukten der vermeintlichen grünen Komponente des Blattgrüns). Die Gründe dieser Lehre habe ich im vorigen Jahre abgelehnt.[4]) Jetzt nimmt Marchlewski an[5]), daß Chlorophyllan von Phylloxanthin und Phyllocyanin nur verunreinigt ist. Daß Chlorophyllan Phylloxanthin enthält, ist wohl einzuräumen, da letzteres wahrscheinlich nichts anderes als Chlorophyllan β ist. Der notwendige Hauptanteil ist aber Chlorophyllan α, und es wäre erst zu beweisen, daß dieser neutrale Stoff sich während der Chlorophyllandarstellung (nach Hoppe-Seyler) auch teilweise zum amphoteren „Phyllocyanin" verändert. Jedenfalls kann das Verhalten eines 8-Jahren-Chlorophyllanpräparates nicht maßgebend sein.

Mit der Annahme, daß Phylloxanthin und Chlorophyllan β identisch sind, scheint übrigens Marchlewski nicht einverstanden zu sein.[6]) Reines Phylloxanthin, behauptet er, besitzt nicht das II. Band des Chlorophyllans β. Da aber dies Band das allerschwächste ist und nur unter günstiger Beobachtungskautelen zu bemerken ist, so erscheint der negative Befund

---

[1]) Tschirch, A., loc. cit. S. 68.

[2]) Marchlewski, L., Diese Zeitschr. 7, 285, 1907.

[3]) Tswett, M., Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 25, 71, 388 Fußnote. 394 Fußnote, 395 1907.

[4]) Tswett, M., Diese Zeitschr. 5, 6, 1907.

[5]) Marchlewski, L., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 453, 1908.

[6]) Marchlewski, L., Diese Zeitschr. 7, 282.

Marchlewskis nicht entscheidend. Von den optischen Eigenschaften des reinen „Phylloxanthins" zu sprechen, ist überhaupt Marchlewski nicht berechtigt, da die chemische Unreinheit des Farbstoffs von ihm selbst zugegeben wird und für die optische Reinheit keine gültigen Beweise anzuführen sind. Das einzige, was in dieser Richtung geschehen ist, war der spektroskopische Nachweis, daß „Phylloxanthin" keine bedeutende Mengen „Phyllocyanin" enthielt.[1]) Warum hat nicht Marchlewski, anstatt zu polemisieren, sein „reines Phylloxanthin" der Adsorptionsanalyse unterworfen, welche ja über die optische Einheitlichkeit eines Farbstoffes so leicht Aufschluß gibt?[2]) Die Behauptung, daß meine Präparate unrein sind, weil ich die Farbstoffe nicht in fester Form dargestellt habe, ist ganz unberechtigt. Die Chlorophyllane wurden mittels Adsorptionsanalyse isoliert, welche eben eine Reinigungsmethode ist und, ihrem Wesen nach, in mancher Hinsicht den Ausscheidungs- oder Auskrystallisierungsmethoden überlegen ist.

Beiläufig sei bemerkt, daß Marchlewskis Auslassung: ich irre mich „auch" bezüglich des Phyllocyanins, ebensowenig wie seine übrige Kritik begründet ist und nur eine ungenügende Kenntnisnahme meiner Arbeiten beweist. Ich habe für das Chlorophyllan *a* (‚welches dasselbe Spektrum wie das Phyllocyaningemenge besitzt') keinen akzentierten Schatten auf der rechten Seite des I. Bandes angegeben. In meiner in dieser Zeitschr. (**5**, 13) wiedergegebenen Zeichnung ist ein Schatten zwischen den Bändern I und II vorhanden, welches der Zeichner aber zu intensiv abgebildet, wie ein Vergleich mit meiner, in den Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **25**, 1907, Tafel III veröffentlichten entsprechenden Zeichnung lehrt. Es sei endlich nochmals betont, daß die äußerst schwachen und schmalen II. Absorptionsstreifen der Chlorophyllane *a* und *β* nur in ganz reinen Lösungen dieser Farbstoffe zu beobachten sind und schon in dem Gemenge derselben nicht bemerkbar sind.

---

[1]) Vgl. meine Ausführungen: Diese Zeitschr. **5**, 24 u. 31.

[2]) Wenn Marchlewski mir eine Probe seines Phylloxanthins zusendet, so bin ich bereit, das Präparat adsorptionsanalytisch und spektroskopisch zu untersuchen und ihm die Resultate zur Verfügung zu stellen.

Ergebnisse.

Der dunkelgefärbte Niederschlag, welcher in alkoholischen Chlorophyllösungen nach Zusatz von organischen Säuren oder Spuren Salzsäure entsteht (Filholscher Niederschlag, Tschirchs Chlorophyllan, Schuncks Sediment, Willstätters Phaeophytin) ist ein Gemisch der nächsten Säurederivaten der beiden Chlorophylline, nämlich ein Gemenge der vom Verfasser früher an dieser Stelle untersuchten Chlorophyllane α und β. Wenigstens läßt er sich in gleiche spektroskopische Eigenschaften und gleiche chemische Reaktionen aufweisende Farbstoffe physikalisch (adsorptionsanalytisch) zerlegen. Beim Eintragen in das zweiphasige Frémysche Äthersalzsäuregemisch geht dementsprechend das Phaeophytin zum sog. Phylloxanthin, welches wahrscheinlich unverändertes Chlorophyllan β ist und zu dem in der Salzsäurephase sich lösenden sog. Phyllocyanin, welches kein unverändertes Chlorophyllan α, sondern hauptsächlich ein Gemenge von nach Willstätters Fraktionierungsmethode isolierbaren Derivaten desselben ist.

Über die Natur des sogenannten „krystallisierbaren Chlorophylls“ (Metachlorophyllins).

Von

M. Tswett.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Warschau.)

(Eingegangen am 12. Mai 1908.)

Geschichtliches.

Bekanntlich hatte Borodin[1]) (1881) beim langsamen Austrocknen von mit Alkohol betupften mikroskopischen Schnitten aus grünen Blättern zahlreicher Pflanzen schöne grüne Krystalle erhalten, welche er, ganz zutreffend, als ein Derivat der vermeintlichen „grünen Komponente“ des Chlorophylls ansah. Später wurden die Krystalle von Monteverde[2])[3]) (1890, 1893) makroskopisch dargestellt und einer eingehenden spektroskopischen Untersuchung unterworfen. Die Substanz wurde von genanntem Forscher als „krystallisierbares Chlorophyll“ bezeichnet, im Gegensatz zu dem „amorphen“, welchen er in der Krausschen Entmischung in den Benzinphase erhielt, und welches auch spektroskopisch etwas abweichend ist. Monteverde glaubte, „amorphes Chlorophyll“ sei ein Derivat und die unversehrte Pflanze enthalte nur „krystallisierbares Chlorophyll“, welches in Benzin unlöslich ist. Er stützte sich dabei auf die Tatsache, daß frische oder getrocknete Blätter dem Benzin oder Petroläther keinen grünen Farbstoff abgeben.

---

[1]) Borodin, J., Über Chlorophyllkrystalle. Sitzungsber. d. Naturforscher-Ges. in St. Petersburg 1881 und Botan. Zeitschr. 1882, 608.

[2]) Monteverde, N., Recherches sur la chlorophylle. Script. botan. Univ. Petrop. 3, II. Teil, 107, 1890.

[3]) Monteverde. N., Das Absorptionsspektrum des Chlorophylls. Acta Horti Petrop. 13, 123, 1893.

Das Irrtümliche dieser Meinung wurde von mir schon 1900 bewiesen, indem ich feststellen konnte, daß die „Unauslösbarkeit" der Chlorophyllfarbstoffe (Karotin ausgenommen) aus frischen oder trockenen Blättern durch Benzin oder Petroläther auf Adsorption beruht.[1–3]) Ich konnte auch den Beweis führen,[2]) daß „krystallisierbares Chlorophyll" ein Derivat der beiden fluorescierenden Bestandteile des Chlorophylls, der Chlorophyllinen α und β ist, dessen mehr oder weniger reichliche Entstehung bei der Extraktion zu regulieren ganz in der Hand des Experimentators liegt. Dem Farbstoff gab ich die Bezeichnung Metachlorophyllin.

Metachlorophyllin bzw. „krystallisierbares Chlorophyll" ist nun neuerdings von Willstätter und Benz[4]) mittels einer vortrefflichen Methode in großer Menge dargestellt und analysiert worden. Willstätter, welchem meine (leider nur in russischer Sprache publizierten) obenerwähnten Mitteilungen unbekannt geblieben sind, glaubt, daß im „krystallisierbaren Chlorophyll" wirklich ein unveränderter genuiner Farbstoff vorliegt, und bringt den Gegensatz zwischen „krystallisierbarem" und „amorphem Chlorophyll" im Verhältnis zu der von Stokes, Sorby und mir festgestellten Dualität des fluorescierenden Anteils des Chlorophylls.

Im folgenden sollen in ausführlicher Weise die Experimente und Tatsachen dargestellt werden, welche beweisen, daß im „krystallisierbaren Chlorophyll" keine genuine Komponente des Chlorophylls, sondern ein übrigens sehr interessantes Derivat der beiden Chlorophylline vorliegt.

Normale und umgekehrte Kraussche Reaktion.

Bevor ein aus grünen Blättern dargestellter Farbstoff als eine genuine, unveränderte Komponente des allein als Chloro-

[1]) Tswett, M., Chlorophylline und Metachlorophylline. Sitzungsber. d. Naturf.-Ges. in St. Petersburg, Okt. 1900. Russisch.

[2]) Tswett, M., Untersuchungen über die physiko-chemische Konstitution des Chlorophyllkorns. Arbeit. d. Naturf.-Ges. Kazan, 35, 1901. Russisch.

[3]) Tswett, M., Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 24, 1906, 316.

[4]) Willstätter, R., und Benz, M., Über krystallisiertes Chlorophyll. Lieb. Ann. 358, 267, 1908.

phyll zu bezeichnenden grünen Farbstoffgemisches betrachtet wird, muß er offenbar folgenden Bedingungen genugtun:

1. Seine spektroskopischen Eigenschaften sollen mit denselben des in situ oder in passender Lösung untersuchten gesamten Pigmentes nicht unvereinbar sein.
2. Seine anderweitigen physiko-chemischen Eigenschaften sollen mit denselben des mittels eines neutralen Lösungsmittels aus der Pflanze momentan extrahierten und sofort untersuchten gesamten Pigmentes nicht unvereinbar sein.

Das „krystallisierbare Chlorophyll", dessen spektroskopisches Verhalten mit demjenigen des integralen Clorophylls auf das beste übereinstimmt (Monteverde), bietet eine sehr charakteristische Eigenschaft: es ist in dem Benzin oder Petroläther unlöslich. Seine alkoholische Lösung, mit Benzin ausgeschüttelt, gibt diesem letzten keinen Farbstoff ab. Auch in der gesamten Chlorophyllösung, aus welcher der Farbstoff erhaltbar ist, dokumentiert sich derselbe durch das Ausfallen der Krausschen Entmischung. Die alkoholische Phase bleibt dann mehr oder weniger, ja selbst exklusiv grün, während nun die Benzinphase gelb (durch Karotin gefärbt) erscheint.

Das teilweise Abweichen von der normalen Krausschen Reaktion war schon in den alkoholischen Chlorophyllauszügen mehrerer Pflanzen von Kraus selbst,[1]) von Pringheim[2]), von Sachsse[3]) und von Nebelung[4]) beobachtet, dürfte übrigens, wie wir weiter sehen werden, nicht immer von dem Borodinschen Farbstoff herrühren. Die „umgekehrte" Kraussche Reaktion wurde 1882 von Macchiati[5]) für die alkoholische Chlorophyllextrakte mehrerer Pflanzen (besonders der Rosaceen und Hesperidaceen) entdeckt. Analoge Erfahrungen machten

---

[1]) Kraus, G., Zur Kenntnis der Chlorophyllfarbstoffe, 1872, 90.

[2]) Pringsheim, N., Über das Absorptionsspektrum der Chlorophyllfarbstoffe. Monatsber. Berlin. Akad. Okt. 1874, 654.

[3]) Sachsse, R., Die Chemie und Physiologie der Farbstoffe usw. 1877, S. 24.

[4]) Nebelung, K., Spektroskopische Untersuchung der Farbstoffe einiger Süßwasseralgen. Botan. Zeit. 36, 380, 1878.

[5]) Macchiati, L., Qualche rettifica sui solventi della clorofylla, Reggio 1882.

dann Arcangeli[1]) und Monteverde[2]), welcher die relative Intensität der Grünfärbung in beiden Phasen der Krausschen Entmischung als Maß für das quantitative Verhältnis seines „amorphen" zum „krystallisierbaren Chlorophyll" ansah.

Monteverde teilt die von ihm untersuchten Pflanzen in drei Gruppen: 1. Pflanzen, deren alkoholische Auszüge viel „amorphes" und wenig „krystallisierbares Chlorophyll" und 2. Pflanzen, welche ein umgekehrtes Verhalten zeigen. 3. Pflanzen, welche einen allmählichen Übergang zwischen den zwei ersten Gruppen bilden. Die alkoholischen Auszüge werden in der Weise hergestellt, daß die klein zerschnittenen Blätter mit kaltem 95 %igem Alkohol während einer oder mehrerer Stunden extrahiert werden.

Um eine schöne umgekehrte Kraussche Reaktion zu erhalten, wurden frische Blätter der 2. Gruppe mit kaltem 95 %igem Alkohol bearbeitet, nach $^1/_2$—1 Stunde der Alkohol abgegossen, wieder neuer aufgegossen, und nach einigen Stunden mit diesem Alkoholauszug die Kraussche Reaktion vorgenommen.

Die Extraktion der Blätter ist somit bei Monteverde sowie auch in den neuesten Untersuchungen Willstätters und Benz' (loc. cit.) eine langsame, und der erhaltene Auszug kann offenbar nicht ohne weiteres als eine „Standartlösung" des genuinen Chlorophylls betrachtet werden. Es muß zuerst gezeigt werden, daß er in seinen Eigenschaften mit dem momentan, unter möglichstem Ausschluß aller verändernden Faktoren des desorganisierten Zellinhaltes, hergestellten Extrakt übereinstimmt.

Unverändertes Chlorophyll gibt immer eine normale Kraussche Reaktion.

Nun zeigt es sich, daß die erwähnte Übereinstimmung bei den „krystallisierbares Chlorophyll" liefernden Pflanzen nicht stattfindet. Der rationell bereitete alkoholische Auszug solcher Pflanzen, ebensogut wie derjenige jeder anderen grünen Pflanze zeigt eine vollständig normale Kraussche Reaktion, und ent-

[1]) Arcangeli, G., Sopra l'esperimento di Kraus. Malpighia 3, 3, 1889.

[2]) Monteverde, N., Absorptionsspektrum usw. loc. cit.

hält somit kein sog. „krystallisierbares Chlorophyll". Dieses letzte ist ein Kunstprodukt.

Zur Prüfung der Angelegenheit habe ich beinahe 40 verschiedene, 30 Pflanzenfamilien angehörende Spezies untersucht; unter anderen auch solche, deren gewöhnliche alkoholische Infuse eine vollständig umgekehrte Kraussche Reaktion geben und viel Borodinsche Krystalle liefern (Cotoneaster, Sorbus, Sambucus, Tilia, Rosa).

Um eine momentane Extraktion des Pigmentes zu erzielen,[1]) ist es notwendig, alle Zellen des Gewebes zu öffnen, da sonst durch die unversehrte, von starkem Alkohol durchtränkte, zusammengeschrumpfte Zellwand die Diffusion der Farbstoffe sehr langsam stattfindet. Ich habe daher die Blätter in kleinen Mengen mit feinem Quarzsand fein und schnell zerrieben und dann während etwa einer halben Minute unter weiterer Zusammenreibung mit starkem Alkohol ausgeschöpft.

Die filtrierte grüne Lösung wurde mit ein wenig Wasser versetzt und mit Petroläther aufgeschüttelt. In allen Fällen wurde eine typisch normale Kraussche Reaktion erhalten.

Um mich davon zu überzeugen, daß die alkoholische, durch die darin dominierenden Xanthophylle gelb gefärbte Phase keine Spuren eines in derselben löslichen, in der Petrolätherphase aber unlöslichen fluorescierenden Farbstoffes („krystallierbares Chlorophyll") enthielt, wurde dieselbe abpipettiert und wiederholt mit erneuten Mengen Petroläthers ausgeschüttelt. Ist der Borodinsche Farbstoff vorhanden, so muß man endlich eine rot fluorescierende alkoholische Schicht erhalten, während die aufschwimmende Petrolätherphase schwächer oder gar nicht leuchtet. Die Fluorescenzprobe bildet das feinste Kriterium auf das Vorhandensein der Chlorophylline und ihrer Derivate; die spektroskopische Untersuchung versagt schon bei

---

[1]) Es wird zu oft, besonders von chemischer Seite vergessen, daß lebende Gewebe keine einfache, in chemischem Gleichgewicht bestehende Stoffgemenge, sondern organisierte Gebilde sind, wo infolge schon der osmotischen Abgrenzungen verschiedenste reaktionsfähige Körper nebeneinander bestehen, und nur nach der mit den Extraktionsprozeduren verbundenen Desorganisierung der Protoplasten ihre gegenseitigen chemischen Potenzen ausüben können.

viel größeren Konzentrationen, wenn man nicht sehr dicke Schichten der Lösung beobachten kann.

Die Prüfung auf Fluorescenz geschah in meinem Luminoskop:[1]) der von unten nach oben durch das Probierrohr in axialer Richtung ziehende Lichtkegel durchsetzte die beiden Phasen und erregte in denselben die rote Fluorescenz. Ich konnte nun in allen Fällen feststellen, daß nach wiederholter Ausschüttelung der alkoholischen Phase mit Petroläther die Fluorescenz darin vollständig erlosch, und zwar früher als in der Petrolätherschicht.

Aus allem vorstehenden ist zu folgern, daß, wenn „krystallisierbares Chlorophyll" wohl in den langsam bereiteten, nicht aber in der momentan hergestellten Lösung vorhanden erscheint, dasselbe ein während der Extraktion entstehendes Artefakt ist, welchem die Bezeichnung Metachlorophyllin wohlt paßt.

Entstehungsbedingungen des Metachlorophyllins.

Momentan hergestellte alkoholische Extrakte aus Rosa-, Tilia-, Sambucus-Blättern zeigen auch nach Stunden keine Umkehrung der Krausschen Reaktion. Das Erscheinen des Metachlorophyllins in kalten alkoholischen Infusen der Blätter deutet also auf die Entstehung desselben während der Extraktion, wobei an die Einwirkung der noch so wenig bekannten Stoffe des Zellinhaltes zu denken ist. Eine zweite Bedingung ist aber Anwesenheit des Alkohols, welcher in dieser Rolle durch Äther, Benzol oder Chloroform ersetzt werden kann.[2])

---

[1]) Tswett, Vorrichtung zur Beobachtung von Fluorescenz und Opalescenzerscheinungen. Zeitschr. f. physikal. Chem. 36, 450, 1901. Eine Verbesserung des Apparates ist neuerdings von Ley und Gorke (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 4473, 1907) vorgenommen worden, welche die gleichzeitige Beobachtung zweier nebeneinanderstehenden Flüssigkeiten erlaubt. Die neue Vorrichtung ist übrigens viel komplizierter als die meine, und wie die Autoren sagen, übertrifft dieselbe an Empfindlichkeit nicht.

[2]) Beide Bedingungen hatte ich in einer kleinen französischen Mitteilung (Compt. rend. 132, 149, 1901) erwähnt. Ich erkläre mir daher nicht, wie es kommt, daß Willstätter (loc. cit. 273) auf die erwähnte Mitteilung Bezug nehmend, mir die Meinung zuschreibt, Metachlorophyllin entstehe „durch die Einwirkung von Alkohol aus dem

Die momentan hergestellte alkoholische Lösung aus fein zerriebenen Blättern obenerwähnter Pflanzen liefert, wie gesagt, eine vollständig normale Kraussche Reaktion. Läßt man aber den Alkohol auf das zerriebene Material längere Zeit bei gehemmter Herauslösung des Pigmentes einwirken (indem man den Brei mit starkem oder 40%igem Alkohol befeuchtet) und zieht dann mit Alkohol aus, so liefert die Lösung eine mehr oder minder vollständig umgekehrte Kraussche Reaktion.

Die Inversion wird zuweilen sehr schnell, im Laufe einiger Minuten, erreicht. In einigen Ende August mit Linden- (Tilia) und Cotoneaster-Blättern angestellten Versuchen, war die Inversion schon nach 5 Minuten vollständig. Sehr schnell stellt sie sich auch bei Rosen-, Holunder- (Sambucus nigra) und Vogelbeerbaum- (Sorbus aucuparia) Blättern ein.

Es seien noch einige Beispiele angeführt.

Vollständige Inversion wurde nach folgenden Zeiträumen beobachtet:

bei Pinus sylvestris	(5. August)	1	Stunde
„ Aspidium spec.	„	$1^1/_2$	Stunden
„ Nuphar luteum	„	$1^1/_2$	„
„ Populus nigra	(6. August)	4	„
„ Urtica dioica	(3. „)	6	„
„ Spinacia oleracea	(5. „)	24	„

Angeführte Zahlen bedeuten nicht die nötige Minimaldauer der Alkoholeinwirkung, sondern nur die Zeit, nach welcher die erfolgreiche Prüfung vorgenommen wurde.

Als Beispiele von Pflanzen, welche selbst nach langdauernder Maceration in verdünntem Alkohol keine Inversion in dem Löslichkeitsverhalten ihrer Chlorophylline zeigen, seien angeführt:

Ledum palustre	(5. August)	16	Stunden
Epilobium angustifolium	„	16	„
Solanum tuberosum . .	„	16	„
Elodea canadensis . .	(18. August)	24	„

natürlichen Chlorophyll“ und diese Meinung durch das ungleichartige Verhalten verschiedener Pflanzen bei dem Krystallisationsversuch von Borodin, sowie durch die Möglichkeit, das Metachlorophyllin mittels Ätherextraktion zu erhalten, widerlegen will. Vom „natürlichen Chlorophyll“ habe ich übrigens nicht gesprochen, weil eine solche Substanz nicht existiert. Mit zwei Chlorophyllinen haben wir zu tun.

Maceration in Wasser bewirkt keine Inversion (Tilia-Blätter, 12 Tage). In seiner Inversion bedingenden Wirkung kann Alkohol durch andere Solvenzien des Chlorophylls ersetzt werden. Holunderblätter wurden mit Quarzsand zerrieben und die Masse in vier Portionen verteilt, welche in geschlossenen Glasdosen der Einwirkung kalter Dämpfe: 1. Chloroforms, 2. Benzols, 3. Äthers unterworfen, während eine 4te Kontrollportion sich selbst überlassen wurde.

Nach $5^1/_2$ Stunden wurden aus allen vier Portionen alkoholische Extrakte momentan hergestellt.

Extrakt aus I. Portion ergab eine halbumgekehrte Kraussche Reaktion; Extrakte aus II. und III. Portion eine umgekehrte und Extrakt aus IV. (Kontroll-)Portion eine normale.

Inversion kann man auch mittels direkter Ätherisierung der Blätter erhalten: In einem verschließbaren Glaszylinder von 100 ccm wurden 6 ccm Äther gegossen und darüber ein Linden- und ein Holunderblatt aufgehängt. Nach einer Stunde wurden die Blätter jedes für sich zerrieben und mittels Alkohols momentan extrahiert. Extrakt aus Linde gab eine umgekehrte Kraussche Reaktion, Extrakt aus Holunder eine halbumgekehrte.

Borodin hatte bemerkt, daß Blätter, die sonst die merkwürdigen grünen Krystalle liefern, es nicht tun, wenn sie vorher in Wasser ausgekocht werden. Analoge Erfahrungen machte Monteverde (loc. cit. 170) an der Hand der Krausschen Reaktion, welche für das Extrakt gekochter Blätter normal bleibt. Auskochung in Alkohol hat dasselbe Resultat.

Bei der Wiederholung dieser Versuche traf ich auf merkwürdige Tatsachen.

Extrahierung von Holunderblättern in kochendem 95%igem Alkohol gab eine Chlorophyllösung mit normaler Krausscher Reaktion, während ein bei 70° C hergestellter Extrakt fast vollständig umgekehrt reagierte. Ähnliches bei der Einwirkung von heißem Wasser. Linden- und Holunderblüten wurden in einem Versuch bei 79 bis 81° C während 5 bis 10 Minuten und in einem zweiten bei 89 bis 90° C während 5 Minuten in Wasser abgebrüht und dann während 3 Stunden in kaltem Alkohol extrahiert, und die erhaltenen Chlorophyllösungen gaben eine umgekehrte Kraussche Reaktion.

Bei mehreren Pflanzen, besonders auffallend bei der Roßkastanie (Aesculus Hippocastanum), liefern die mit heißem (70 bis 80° C) Leitungswasser behandelten Blättern eigentümliche sich im Wasser kolloidal lösende Derivate der Chlorophylline. Die Frage werde ich in einer späteren Mitteilung behandeln; es sei aber hier betont, daß diese Derivate sich in der Krausschen Entwicklung gleich wie der Borodinsche Farbstoff verhalten.

Ist Metachlorophyllin eine einheitliche Substanz?

Im vorigen Paragraph wurde gezeigt, wie man mittels geschickter Einwirkung von Alkohol (oder Äther, Benzol, Chloroform) auf zerriebene Blätter einiger Pflanzen eine Modifizierung der Chlorophylline hervorrufen kann, die sich in der Umkehrung ihres normalen Verhaltens in der Krausschen Entmischung kund macht. Es wurde dabei stillschweigend angenommen, daß das dabei entstehende Derivat (oder Gemisch von Derivaten) mit dem Borodinschen so leicht krystallisierenden Derivat (Metachlorophyllin, bzw. „krystallisierbares Chlorophyll") identisch ist. Diese Identität ist zwar wahrscheinlich, jedoch nicht bewiesen. Aus den nach meiner Methode hergestellten metachlorophyllinführenden Extrakten aus Lindenblättern konnte ich beim Eindunsten keine grünen Krystalle erhalten.[1]) Ursache davon kann übrigens in der Anwesenheit von krystallisationhemmenden Substanzen liegen, welche aus den unversehrten Zellschachteln in Borodinschen und Monteverdes Versuchen nicht diffundieren können, in meinen Experimenten aber aus dem zerriebenen Gewebe leicht in Lösung heraustreten. Um die Frage zu prüfen, wird man wohl am besten zu der Willstätterschen Methode der Metachlorophyllindarstellung greifen und die nach meiner Vorschrift hergestellten alkoholischen Extrakte mit Äther ausschütteln.

Es ist aber wohl angezeigt, das nach Borodin, Monteverde, Willstätter und das nach meiner Methode herge-

[1]) Als ich jedoch Lindenblätter ohne Sandzusatz zerrieb, aus der Masse kleine Kügelchen zusammenknetete und davon einen langsam verlaufenden Aufguß bereitete, so gab mir dieser letzte die Borodinschen Krystalle in reichlichen Mengen.

stellte Derivat der Chlorophylline vorläufig unter derselben generischen Bezeichnung (Metachlorophyllin) zu registrieren und den Borodinschen Farbstoff mit dem Buchstaben α provisorisch zu unterscheiden.

Beziehungen des α-Metachlorophyllins („krystallisierbares Chlorophyll") zu den genuinen Chlorophyllinen.

Spektroskopische Beziehungen. Die spektroskopischen Eigenschaften des Borodinschen Farbstoffes wurden in verschieden konzentrierten alkoholischen Auflösungen von Monteverde (loc. cit.) und neuerdings von Willstätter und Benz (loc. cit.) untersucht und die Resultate stimmen in sehr befriedigter Weise zusammen. Das Spektrum ist sehr ähnlich demjenigen des gesamten Chlorophylls, indem es zwischen den Wellenlängen 400 und 700 $\mu\mu$ 6 Bänder in derselben Lage und Intensitätsreihe aufweist.

Dies Spektrum, wie ich es schon für das Chlorophyll hervorgehoben habe,[1]) zeigt auf das deutlichste seine Zusammensetzung aus den Chlorophyllinen α- und β-Spektren.[2]) Band I, welches aus zwei in verdünnten Lösungen nachweisbaren ungleich starken Hälften besteht, gehört in seinem mehr intensiven linken Teil, dem Chlorophyllin α, in seinem rechten aber dem Chlorophyllin β.[3]) Bänder II und III sowie Band VI

---

[1]) Ber. d. botan. Gesell. 25, 147. Die Kombination habe ich in vitro realisiert. Um dieselbe aber auf dem Papier auszuführen, muß man ganz selbstverständlich nicht die Spektrogramme 4 und 8 meiner Tabelle kombinieren, wie es Marchlewski in einem polemischen Aufsatz tut, wo er meine Ergebnisse widerlegen wollte (Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 25, 226, 1907). Es würde ja einem umgekehrten quantitativen Verhältnis der Chlorophylline entsprechen und ad absurdum führen. Naturgemäß sollen die Spektrogramme 4 und 7 oder 3 und 6 kombiniert werden.

[2]) Die von dem Karotin und den Xanthophyllen verursachten Absorptionen im Blau-Violett machen sich bei der Beobachtung sehr verdünnter Chlorophyllösungen nicht kund. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 25, 148.

[3]) In lebenden Blättern erscheint das I. Band deutlich doppelt (Lommel, Schönn, Wegscheider, Mann, Monteverde, Tswett). Der Doppelart der Chlorophylline entspricht die Doppelart des roten Fluorescenzlichtes in Chlorophyllösungen (Sorby, Hagenbach).

sind hauptsächlich durch Chlorophyllin α verursacht, während Band V exklusiv dem Chlorophyllin β gehört und das IV. aus dem Übereinandergreifen der linken Seite des IV. Chlorophyllin-α- und der rechten Seite des V. Chlorophyllin-β-Bandes herrührt.

Auf Grund der spektroskopischen Untersuchung müssen wir also annehmen, daß α-Metachlorophyllin („krystallisierbares Chlorophyll"), falls es ein chemisches Individuum und nicht ein isomorphes Gemisch ist, eine Verbindung der beiden genuinen Chlorophylline, mögchlicherweise mit einer dritten Substanz darstellt.

Chemische Beziehungen. Die chemische Untersuchung des sog. „krystallisierbaren Chlorophyll" ist neuerdings von Willstätter und Benz (loc. cit.) unternommen worden. Die analytische Untersuchung des noch nicht in ganz reinem Zustande erhaltenen Farbstoffes ergab vorläufig, daß die Substanz magnesiumhaltig und phosphorfrei ist und bei der Verseifung kein Phytol liefert. Phytol ist bekanntlich ein Alkohol, den Willstätter bei der Verseifung eines in vorstehendem Aufsatze besprochenen Derivates der Chlorophylline, des Phaeophytins, erhielt und den er als in die Moleküle des hypothetischen „Chlorophylls" (Chlorophylline α und β) gehörend betrachtet.

Ist diese Annahme (deren Gründe mir jedoch nicht als zwingend erscheinen) zutreffend, so hätten wir also die postmortale Umwandlung der Chlorophylline in Metachlorophyllin als mit Phytolabspaltung verbundene Verbindung derselben zu betrachten.

Um die Frage nach den chemischen Beziehungen des Metachlorophyllins zu den Chlorophyllinen zu lösen, wird es natürlich nötig sein, diese letztere in genuinem reinem Zustande zu erhalten und zu untersuchen. Der Weg dazu ist nun in meiner adsorptionsanalytischen Methode gegeben.

Jedenfalls steht es schon jetzt fest, daß der Gegensatz zwischen phytolfreiem sog. „krystallisierbarem Chlorophyll" und dem sog. „amorphen Chlorophyll" gar nichts mit der tatsächlichen Dualität der genuinen Chlorophylline zu tun hat.

Ergebnisse.

Das sog. „krystallisierbare Chlorophyll" (α-Metachlorophyllin) ist keine natürliche Komponente des Chlorophylls, sondern ein Kunstprodukt, welches bei der langsamen Extraktion der Blätter vieler Pflanzen unter Einwirkung noch unbekannter Faktoren des Zellchemismus aus den genuinen Chlorophyllinen entsteht. Momentan hergestellte, also unveränderte, Chlorophyllauszüge sind stets frei von genanntem Derivat.

In seinem Spektrum vereinigt dasselbe die Absorptionsbänder der Chlorophylline α und β und ist also als ein Sammelderivat dieser genuinen Farbstoffe zu betrachten.

Das neue System der sogenannten Chlorophyllderivate.

Von

M. Tswett.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Warschau.)

(Eingegangen am 12. Mai 1908.)

Die Erkenntnis, daß im Blattgrün kein traditionelles grünes „Reinchlorophyll" existiert, sondern zwei fluoreszierende Chlorophylline vorhanden sind, dessen minder reichlich vertretene nicht weniger als den fünften Teil des anderen ausmacht[1]), und also keine quantité négligeable ist; die Darstellung ferner, und die Untersuchung dieser Chlorophylline und ihrer nächsten Derivate in optisch reinem Zustande[2]) führen zu einer vollständigen Umänderung des in den letzten Dezennien entworfenen Systems der sog. Chlorophyllderivate.

Der Stammbaum der sog. Chlorophyllderivate ist ein „diphyletischer" und nicht ein „monophyletischer", wie man bisher glaubte.

Es sei in folgendem Schema das dem jetzigen Tatsachenbestand entsprechende System in seinen hauptsächlichsten Zügen skizziert.

Mehrere Derivate wurden in der Tabelle nicht aufgenommen, weil ihr genetischer Zusammenhang mit den anderen noch nicht klar genug liegt. Phyllotaonine und Phylloporphyrin würden einerseits mit den Phytochlorinen und Phytorhodinen, andererseits mit der Chlorophyllinsäure *a* zu verknüpfen sein. Kożniewski's[3]) und Marchlewski's Phylloxanthrubin und

[1]) Tswett, M., Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **24**, 384, 1906, **25**, 395, 1907.

[2]) Tswett, M., Loc. cit. **24**, 138, 1907 und Diese Zeitschr. **5**, 6, 1907.

[3]) Kożniewski, T., und Marchlewski, L., Liebigs Ann. **355**, 216, 1907.

Phylloxanthverdin sind als Spaltungsprodukte des Chlorophyllans β zu betrachten, obgleich eine wirkliche Garantie noch nicht vorliegt, daß der Ausgangsstoff, das Phylloxanthin, ganz frei von Chlorophyllan α war. Das von den Autoren herangezogene spektroskopische Kriterium der optischen Reinheit kann ja, wie ich es bereits hervorgehoben habe[1]), nur bezeugen, daß keine relativ bedeutenden Mengen des zweiten Farbstoffes beigemischt sind. Hier muß die chromatographische Adsorptionsanalyse einsetzen.

Willstätters Phytochlorine und Phytorhodine habe ich einfach als Derivate der Chlorophyllane verzeichnet; zurzeit ist es nicht möglich, die speziellen Derivaten des Chlorophyllans α und des Chlorophyllans β zu bezeichnen. Bei der Auflösung des Chlorophyllans α (oder direkt des Chlorophyllins α) in starker Salzsäure entsteht nicht ein einheitliches Derivat, sondern mehrere[2]), deren Gemenge das sog. Phyllocyanin bildet. Ob das Schunckssche unkrystallisierte Phyllocyanin und der neuerdings von Marchewski[3]) erwähnte, in 15%iger Salzsäure lösliche Stoff einheitliche Präparate sind, bleibt dahingestellt. In der Schunckschen Phyllocyanindarstellung muß jedenfalls auch etwas zersetztes Chlorophyllan β in die Salzsäurephasen übergehen[4]).

In der Tabelle habe ich auch das Metachlorophyllin (sog. „krystallisierbares Chlorophyll") fortgelassen, welches, wie im vorstehenden Aufsatz gezeigt wurde, ein ohne Einwirkung energischer chemischer Reaktion entstehendes Sammelderivat der beiden Chlorophylline ist. Das entsprechende erste Säurederivat ist Willstätters Phaeophorbin.

Zum Schluß sei einer Prioritätsfrage, betreffend die Definition des Wortes Chlorophyllin nochmals gedacht. Timiriazef[5]) hatte die Bezeichnung für die vermeintliche genuine grüne Komponente des Chlorophylls, welche er an der Hand eines Verseifungsprozesses isoliert zu haben glaubte, ein-

---

[1]) Tswett, M., Diese Zeitschr. **5**, 31, 1907.

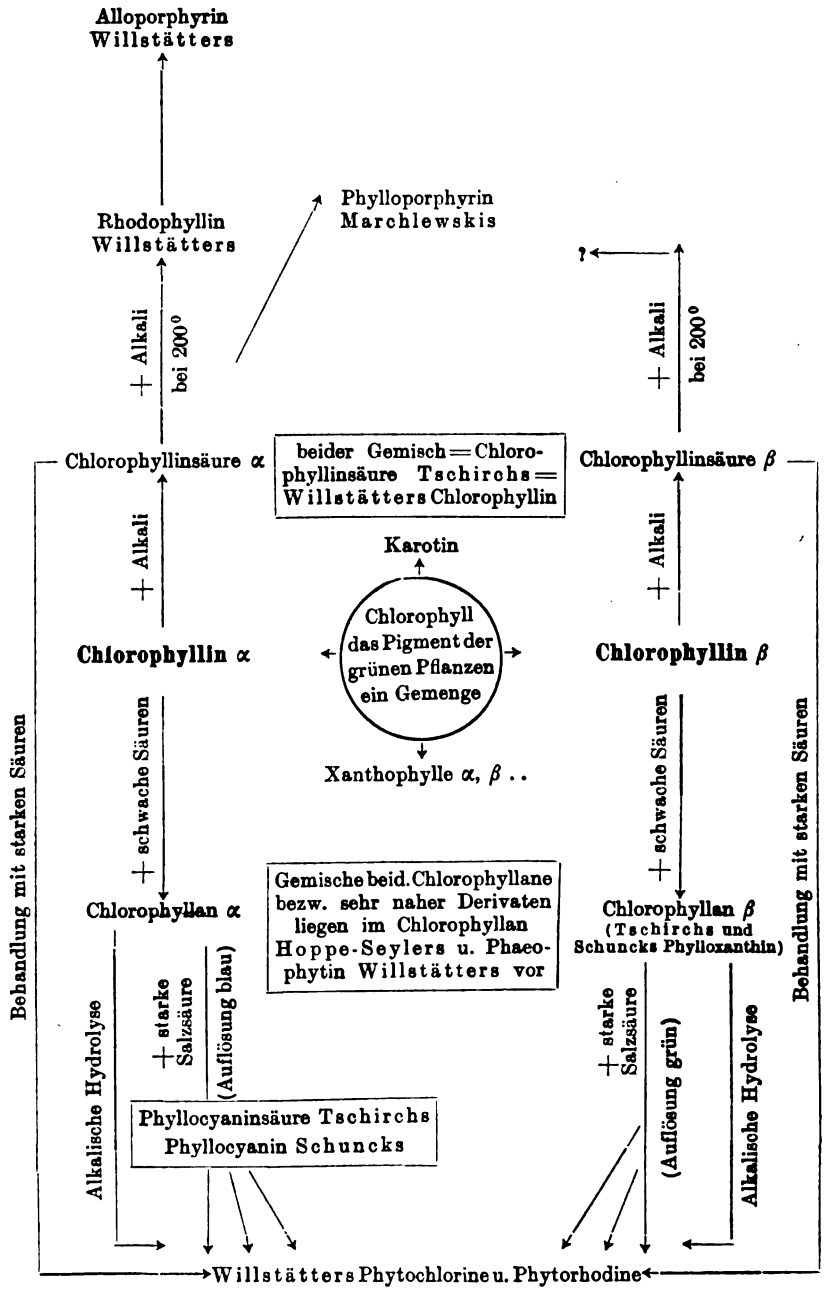
[2]) Tswett, M., ibid. 23, 16. Vgl. Willstätter und Mieg, Liebigs Ann. **350**, 1, 1906.

[3]) Marchlewski, L., Diese Zeitschr. **7**, 284, 1908.

[4]) Tswett, M., Diese Zeitschr. **5**, 23, 1907.

[5]) Timiriazef, C., Analyse spectrale de la chlorophylle, Petersbourg 1871.

Genetische Beziehungen der Chlorophyllinderivate



geführt. Er erkannte selbst (S. 32), daß der durch Bariumhydroxyd niedergeschlagene Farbstoff mit dem genuinen nicht identisch ist, indem er „in seiner Konstitution erschüttert erscheint", bezeichnete jedoch als Chlorophyllin, auch in späteren[1]) Arbeiten, die genuine Komponente. In derselben Fassung, und zwar ohne Bezug auf das Tirmiriazefsche Alkaliderivat, wurde das Wort von Schütt[2]) (1887) und von Nadson[3]) (1893) benutzt. Als ich meinerseits die Dualität des fluorescierenden Anteils des Chlorophylls erkannte[4]) (1900), unterschied ich die Chlorophylline α und β. Wenn also Willstätter, welchem die genannten Arbeiten augenscheinlich nicht bekannt waren, 1906 das Wort Chlorophyllin für ein Alkaliderivat benutzte, so liegt offenbar ein Prioritätsrecht nicht auf seiner Seite.

[1]) Timiriazef, C., Compt. rend. **120**, 467, 1895.

[2]) Schütt, F., Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **5**, 259, 1887 und **6**, 36, 1888.

[3]) Nadson, G., Scripta botan. Univ. Petropol. **4**, 170, 1893.

[4]) Tswett, M., Compt. rend. **131**, 842, 1900, **132**, 149, 1901, und eine Reihe späterer Abhandlungen.

Zur Kenntnis der Seruminaktivierung.

Von

E. Seligmann.

(Aus dem Untersuchungsamt der Stadt Berlin.)

(Eingegangen am 13. Mai 1908.)

Den nachstehenden Untersuchungen lag folgende Überlegung zugrunde: es ist möglich, daß die Inaktivierung komplementhaltiger Sera nicht sowohl in der Zerstörung aktiver Gruppen (Komplement) besteht, als vielmehr in dem Auftreten neuer Substanzen, die die aktivierenden Eigenschaften des Serums verdecken (Hemmungskörper).

Zu den Versuchen diente das hämolytische System: Hammelblutkörperchen — inaktives Kaninchenimmunserum (als Amboceptor) — frisches Meerschweinchenserum (als Komplement). Als Amboceptormenge wurde die 4- bis 5fach lösende Dosis verwandt, vom Komplement im allgemeinen 0,1 ccm.

Geprüft wurden zuerst die Reaktionsverhältnisse des aktiven und inaktiven Meerschweinchenserums. Es ergab sich, wie auch schon v. Liebermann[1]) gefunden hat, Zunahme der Alkalität durch Hitzeinaktivierung. Zur Bestimmung der Reaktion wurden 0,5 ccm Serum mit 8 ccm destilliertem Wasser verdünnt und gegen $^{n}/_{200}$-Natronlauge resp. -Salzsäure titriert (Indikator Phenolphtalein). Titer der Lauge und des destillierten Wassers wurden jedesmal bestimmt und in Rechnung gebracht. Es erforderten beispielsweise zur Neutralisation:
0,5 ccm frisches Meerschweinchenserum: 0,18 ccm $^{n}/_{200}$-NaHO,
0,5 ccm desselben Serums nach $^{1}/_{2}$stündiger Erwärmung auf 56 ° C und Abkühlung: 0,28 ccm $^{n}/_{200}$-HCl.

---

[1]) Arch. f. Hygiene 62, 1907.

Das Säurebindungsvermögen durch die Inaktivierung hat also in diesem Versuche um 0,92 ccm $^{n}/_{200}$-HCl pro ccm zugenommen.

Gleicht man diesen Unterschied wieder aus durch Zusatz der entsprechenden Menge Säure, so wird das hämolytisch inaktive Serum nicht wieder aktiviert.

Die gleiche Erscheinung der Alkalitätszunahme findet man beim Älterwerden von Seris. Bekanntlich tritt beim Lagern von Komplementseris eine Abnahme der Aktivität ein, die bis zur vollkommenen Inaktivierung führen kann. Hand in Hand hiermit geht ein Ansteigen der alkalischen Reaktion. Während aber die Alkalitätszunahme ganz regelmäßig erfolgt, wird die Aktivitätsabnahme des Komplementserums durch die verschiedensten individuellen und äußeren Einflüsse bestimmt. Man findet Sera, die schon nach 3 Tagen jede Spur von Komplement verloren haben, und andere, die noch nach 10 bis 14 Tagen genügend aktiv sind, um das System Blut-Amboceptor zu kompletieren. Die Alkalitätszunahme aber zeigt derartige Verschiedenheiten nicht.

So erforderten z. B.

0,5 ccm frisches Meerschweinchenserum 0,1 ccm $^{n}/_{200}$-NaHO,
0,5 „ desselben Serums (10 Tage alt) 0,40 „ $^{n}/_{200}$-HCl,
0,5 „ „ „ (14 Tage alt) 0,44 „ $^{n}/_{200}$-HCl,

Das 14 Tage alte Serum war nicht mehr imstande, als Komplementträger zu dienen; eine Aktivierung durch entsprechenden Säurezusatz (0,9 ccm $^{n}/_{200}$-HCl pro Kubikzentimeter Serum) war nicht möglich.

Nach diesen Versuchen ist also die Alkalitätszunahme nicht der Grund für die Inaktivierung des Komplementserums, ohne daß deshalb ein kausaler Zusammenhang zwischen den beiden Erscheinungen ausgeschlossen ist.

Man könnte sich z. B. denken, daß durch die Erhitzung oder beim Lagern Hydroxylgruppen vom Komplementmolekül abgespalten werden. Die abgesprengten OH-Gruppen vermehren den Gehalt des Serums an freiem Alkali, während der Komplementrest inaktiv geworden ist. Neutralisation des freien Alkalis durch Säure kann dann natürlich an der Inaktivität des Komplementrestes nichts ändern.

Weitere Versuche wurden nach folgender Anordnung vorgenommen. Aktives Meerschweinchenserum wurde bei 56° C inaktiviert und dann in verschiedenen zeitlichen Kombinationen mit einem System von Blut-Amboceptor-Komplement vermischt. War in dem Serum durch die Inaktivierung ein Hemmungskörper entstanden, so mußte dieser die Hämolyse des Systems behindern. Zur Anwendung kam zunächst eine Menge inaktiven Serums, die das Doppelte der im System benutzten Komplementmenge ausmacht. Beobachtung im Brutschrank während zweier Stunden.

I.

Blutart: 5%ige Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen in physiol. Kochsalzlösung. Amboceptor 0,005 ccm Kaninchenimmunserum. Komplement 0,1 ccm aktives Meerschweinchenserum. Alles aufgefüllt auf 4 ccm mit physiol. Kochsalzlösung.

	Einer Mischung von	wird nach 1 Std. Aufenthalt bei 37° hinzugefügt
1	Blut + Amboceptor + Komplement	0
2	Blut + Amboceptor + inakt. Meerschweinchenserum (0,2)	0
3	Blut + Amboceptor + inakt. Meerschweinchenserum (0,2) + Komplement	0
4	Blut + inakt. Meerschweinchenserum (0,2)	Amboceptor + Komplement
5	Blut + Amboceptor + inakt. Meerschweinchenserum (0,2)	Komplement
6	Blut + Komplement + inakt. Meerschweinchenserum (0,2)	Amboceptor
7	Komplement + inakt. Meerschweinchenserum (0,2)	Blut + Amboceptor

Resultat:

1. komplet,
2. ungelöst,
3. komplet,
4. Hemmung,
5. „
6. Hemmung
7. „

Es hat also in den Röhrchen 4 bis 7 in der Tat eine Hemmung der Hämolyse stattgefunden. Die Hemmung ist keine vollständige, ein Teil der Blutkörperchen ist in Lösung gegangen, ein anderer Teil hat sich abgesetzt. Am ausgesprochensten ist die Behinderung der Hämolyse bei 4, schwächer, aber auch noch sehr deutlich bei den anderen Kombinationen. Auch in 3, wo nach dem Protokoll eine Behinderung nicht in die Erscheinung tritt, ist sie in sehr geringem Grade vorhanden, insofern als die Hämolyse in der Kontrolle 1 etwas schneller zustande kommt als bei 3. Am Ende des Versuchs, wo die Resultate notiert wurden, war in beiden Röhrchen bereits komplete Lösung erfolgt. In sämtlichen Röhrchen tritt nach einigen Stunden Nachlösung ein, auch bei Zimmertemperatur.

Das Ergebnis dieses Versuches ist also, daß durch das Inaktivieren von komplementhaltigem Meerschweinchenserum dies Serum die Eigenschaft erlangt, die Hämolyse in gewissem Grade zu behindern. Wir nehmen an, daß ein Hemmungskörper entstanden ist.

Dieser Hemmungskörper ist ebenfalls vorhanden in einem Serum, das durch Lagern seine Aktivität eingebüßt hat. Er wirkt in genau der gleichen behindernden Weise wie der durch Hitzeinaktivierung entstandene.

Da konform mit dem Auftreten des Hemmungskörpers die Zunahme der Alkalität des Serums geht, lag der Gedanke an einen Zusammenhang dieser beiden Phänomene nahe. Es gelingt jedoch nicht, durch Neutralisation der Alkalizunahme, die Hemmungswirkung des Serums aufzuheben.

Der Hemmungskörper tritt bereits nach $^1/_2$ stündigem Erhitzen auf 51°, wo das Meerschweinchenserum im allgemeinen noch aktiv bleibt, in die Erscheinung, er wird stärker wirksam nach Erhitzen auf 56° und noch stärker nach $^1/_2$ stündigem Erwärmen auf 60°.

Durch Behandeln mit Hefe (v. Dungern[1]) läßt sich der Hemmungskörper aus dem Serum entfernen:

1 ccm bei 56° inaktivierten Komplementserums wird mit 1 ccm einer dichten Hefeaufschwemmung versetzt, 1 Stunde

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1900, Nr. 20.

bei 37° gehalten, dann zentrifugiert. Die überstehende, klare Flüssigkeit wird abpipettiert. 0,4 ccm davon (= 0,2 ccm des Serums) werden mit 1 ccm Hammelblut 1 Stunde bei 37° digeriert, dann mit 0,005 ccm Kaninchenamboceptor und 0,1 ccm frischem Meerschweinchenserum versetzt.

Nach 1 Stunde: komplete Lösung.

Die Kontrolle mit dem nur durch Hitze inaktivierten Serum ergab Hemmung.

Es erhob sich nun die Frage: wie wirkt dieser Hemmungskörper? Wo ist sein Angriffspunkt?

Es war an verschiedene Möglichkeiten zu denken. Einmal konnte es sich um Komplementoide (Ehrlich und Sachs[1]) handeln, sodann um Amboceptoide (Neisser und Döring[2]), oder aber um Antiamboceptoren oder schließlich um Antikomplemente.

Gegen die Annahme von Komplementoiden spricht die Tatsache, daß die Hemmung dann am stärksten in die Erscheinung tritt, wenn Blutkörperchen und Hemmungskörper 1 Stunde miteinander in Berührung gewesen sind, (s. I Röhrchen 4); dagegen spricht ferner, daß in Röhrchen 7 des ersten Protokolls gleichfalls Hemmung zu beobachten ist; denn bei Annahme eines Komplementoids hätte hier dasselbe Verhalten wie in Röhrchen 3 eintreten müssen, wo bei gleichzeitigem Zusatz von Komplement und Hemmungskörper Lösung eintrat.

Der Beweis, daß es sich nicht um Komplementoide handeln kann, ist folgendermaßen geführt worden:

3 ccm Hammelblut werden mit 3 ccm Kaninchenamboceptor (je 0,008 ccm) + 0,6 ccm inaktiven Meerschweinchenserums 2 Stunden bei 37° gehalten, dann zentrifugiert, mehrmals gewaschen und auf 3 Röhrchen verteilt:

zu 1 kommt: 0,1 ccm frisches Meerschweinchenserum,
zu 2 „ 0,1 ccm „ „ + 0,08 ccm Amboceptor,
zu 3 „ 0.

Sämtliche Röhrchen auf 5 ccm aufgefüllt.

Resultat: 1 komplet, 2 komplet, 3 ungelöst.

Damit ist bewiesen, daß bei 37° wohl Amboceptor von

---

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1901, Nr. 10.
[2]) Berl. klin. Wochenschr. 1901, Nr. 22.

den Blutkörperchen gebunden wurde, nicht aber das hypothetische Komplementoid (1). 2 und 3 sind Kontrollen. Die Aviditätsabnahme der Komplementoide kann hier nicht eingewandt werden, weil sie bei dem Vorversuch (ohne Zentrifugieren und Abgießen der Zwischenflüssigkeit) auch nicht in die Erscheinung getreten ist.

Die Annahme von Komplementoiden ist also abzulehnen.

Aber auch um Amboceptoide kann es sich nicht handeln:

3 ccm Hammelblut werden mit 0,6 ccm inaktiven Meerschweinchenserums 2 Stunden bei 37° digeriert, dann zentrifugiert, gewaschen und auf 3 Röhrchen verteilt:

zu 1 kommt: 0,008 ccm Amboceptor + 0,1 ccm Komplement,
zu 2 „ 0,008 „ „
zu 3 „ 0.

Sämtliche Röhrchen auf 5 ccm mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt.

Resultat: 1 komplet, 2 ungelöst, 3 ungelöst.

Eine Bindung zwischen Blutkörperchen und Hemmungskörper, die bei Annahme eines Amboceptoids zu erwarten wäre, ist demmnach nicht eingetreten.

Zur Prüfung, ob es sich etwa um einen Antiamboceptor handelt, wurden 1 ccm Kaninchenamboceptor (0,008) + 0,2 ccm inaktiven Meerschweinchenserums 1 Stunde bei 37° gehalten. Darauf wurde 1 ccm Hammelblut hinzugefügt. Weiterer 1 stündiger Aufenthalt im Brutschrank. Jetzt wurde zentrifugiert und gewaschen. Handelte es sich um einen Antiamboceptor, so konnten die Hammelblutkörperchen nicht sensibilisiert worden sein, da ja Amboceptor und Antiamboceptor schon miteinander reagiert hatten. Bei Zusatz von Komplement durften sie daher nicht in Lösung gehen. Der Versuch bewies das Gegenteil. Zufügen von 0,1 ccm aktiven Meerschweinchenserums bewirkte komplete Hämolyse der Blutkörperchensedimente. Der Hemmungskörper ist also auch kein Antiamboceptor.

Daß er aber auch kein Antikomplement ist, wurde auf etwas anderem Wege bewiesen. Darüber später. Vorerst wurde untersucht, ob die Hemmung eine spezifische ist, oder ob inaktives Meerschweinchenserum imstande ist, auch andere hämolytische Prozesse als den bisher untersuchten zu behindern.

Normales Hundeserum löst Meerschweinchenblutkörperchen. Versetzt man die Meerschweinchenblutkörperchen mit inaktivem Meerschweinchenserum, so wird ihre Hämolyse durch Hundeserum gleichfalls behindert. Dieselbe Behinderung erfährt die Hämolyse von Hammelblutkörperchen durch normales Hundeserum, wenn die Erythrocyten mit inaktivem Meerschweinchenserum versetzt worden sind.

Inaktives Hundeserum löst Hammelblutkörperchen nach Zusatz von frischem Meerschweinchenserum.

Auch diese Hämolyse wird durch Vorbehandlung mit inaktivem Meerschweinchenserum behindert.

Es zeigt sich also, daß der Hemmungskörper keinen spezifischen Charakter hat, da er eine Reihe verschiedener hämolytischer Reaktionsvorgänge zu behindern imstande ist. Gleichzeitig ist durch diese Versuche aber auch bewiesen, daß er kein Anti-Meerschweinchenkomplement ist, da seine Hemmungskraft keineswegs an die Gegenwart von Meerschweinchenkomplement gebunden ist.

Dies ganze Verhalten, namentlich die Unmöglichkeit, eine Reaktion zwischen dem Hemmungskörper und Blutkörperchen, Amboceptor oder Komplement nachzuweisen, macht es unwahrscheinlich, daß es sich bei der Hemmung der Hämolyse durch inaktives Meerschweinchenserum um chemische Reaktionsvorgänge handelt. Wir sind vielmehr geneigt, den Vorgang unter physikalischen Gesichtspunkten zu betrachten und zu den Adsorptions- und Umhüllungserscheinungen zu rechnen. In diesem Sinne sei auch auf die Angaben von Traube hingewiesen, der in einer der letzten Sitzungen der Berliner Physiologischen Gesellschaft mitteilte, daß die Oberflächenspannung der Sera sich durch die Inaktivierung ändert; er nimmt daraufhin an, daß neue Körper bei der Inaktivierung entstehen, die physikalisch den allein wirksamen Amboceptor an der Vollbringung der Hämolyse hindern.

Ich will zu den Traubeschen Anschauungen hier nicht Stellung nehmen; jedenfalls aber ist durch die vorliegenden Untersuchungen das Auftreten eines Hemmungskörpers bei der Inaktivierung bewiesen. Daß dieser Hemmungskörper nicht imstande ist, die Unwirksamkeit inaktivierter Sera allein zu erklären, soll ohne weiteres zugegeben werden.

Zur Kenntnis des Hämopyrrols.

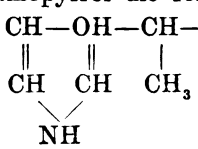
Von

L. Marchlewski und J. Retinger.

(Eingegangen am 14. Mai 1908.)

Zu den wichtigsten Entdeckungen auf dem Gebiet der Blutfarbstoffforschung in den letzten Jahren gehört unzweifelhaft die des Hämopyrrols durch Nencki und Zaleski[1]). Die Methode, welche diese Forscher zur Darstellung des Hämopyrrols angegeben haben, ist auch heute noch stets im Gebrauch. Sie beruht auf der Reduktion des Hämins durch Jodwasserstoffsäure bei Anwesenheit von Jodphosphonium in essigsaurer Lösung.

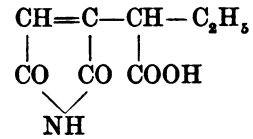
Die Entdecker des Hämopyrrols gaben ihm auf Grund von Analysen seiner Doppelverbindung mit Quecksilberchlorid und mit Pikrinsäure die Formel $C_8H_{13}N$ und betrachteten die sonstigen physikalischen und chemischen Eigenschaften desselben als Beweise, daß die Substanz ein Pyrrolhomologes sein muß. Es wurden zwei Möglichkeiten diskutiert, nämlich daß Hämopyrrol Butylpyrrol oder Methylpropylpyrrol sei. Für die erstere Annahme schienen die Versuche von Kölle[2]) zu sprechen, nach welchen die Küstersche Hämatinsäure $C_8H_8O_5$ durch Jodwasserstoffsäure zu der Säure $C_8H_{12}O_6$ reduziert wird, welche mit der Äthyltricarballylsäure identisch zu sein schien. Danach konnte dem Hämopyrrol die folgende Formel zukommen:



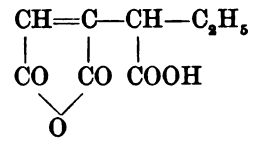
[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34**, 1007, 1901.

2) Kölle, Inauguraldissertation 1898.

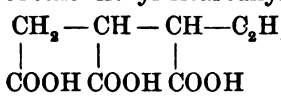
Bei der Oxydation eines solchen β-izo-Butylpyrrols könnte dann die Säure:



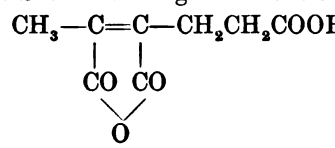
entstehen, welche schließlich die Hämatinsäure:



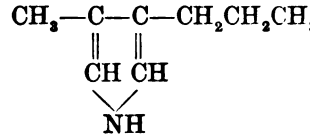
und diese die Auwersche Äthyltricarballylsäure liefern würde:



Wahrscheinlicher war aber die Annahme, daß tatsächlich im Hämopyrrol Methyl- n-Propylpyrrol vorliegt, worauf die genannten Forscher bereits ebenfalls aufmerksam machten. Küster hat nachgewiesen, daß die Hämatinsäure leicht Kohlensäure abspaltet und in eine Substanz übergeht, welche nach ihm zweifelsohne identisch ist mit Methyl-Äthylmaleinsäureanhydrid, und außerdem, daß die Hämatinsäure bei energischer Oxydation unter anderen Bernsteinsäure liefert.[1]) Daraus folgte, daß diese Säure die folgende Konstitution besitzen muß:



und daß Hämopyrrol, falls ihm die von Nencki und Zaleski zugeschriebene Zusammensetzung wirklich zukommt, Methyl-n-Propylpyrrol sein muß:



Es schien leicht zu sein, diese Auffassung durch weitere Experimente zu stützen. In Anbetracht der Versuche von

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 2948, 1902.

Plancher[1]), die die Oxydation von Pyrrolhomologen zum Zwecke hatten, konnte man erwarten, daß Hämopyrrol bei der Oxydation in das Imid der Methyl-n-Propylmaleinsäure übergeführt werden wird. In der Tat gelang es Küster, Hämopyrrol zu einem Imid zu oxydieren, aber dasselbe erwies sich als verschieden von dem erwarteten Methyl-n-Propylmaleinsäureimid.[2])

Von anderen Gesichtspunkten geleitet versuchte Marchlewski mit seinen Mitarbeitern der Frage nach der Konstitution des Hämopyrrols näher zu treten. Für Marchlewski war Hämopyrrol besonders deswegen von höchstem Interesse, weil es ihm mit Nencki gelang nachzuweisen, daß Hämopyrrol auch bei der Reduktion des Phyllocyanins[3]), eines Derivates des Chlorophylls, gebildet wird, was übrigens auf Grund der von Schunck und Marchlewski bewiesenen nahen chemischen Verwandtschaft des Hämato- und Phylloporphyrins zu erwarten war. Gestützt auf Versuche von Bell über die Umwandlung von Succinimid in Pyrrol haben Marchlewski und Buraczewski[4]) versucht, das Hämopyrrol synthetisch darzustellen. Sie stellten Methyl- n- Propylmaleinsäureimid nach der Methode von Michael dar und unterwarfen es der Einwirkung von Zinkstaub bei erhöhter Temperatur und Anwesenheit von Wasserstoff. Das leider nur in geringer Menge erhältliche Produkt verhielt sich in der Tat dem natürlichen Hämopyrrol sehr analog, aber bindende Beweise für die Identität beider Produkte konnten aus Mangel an Substanz nicht erbracht werden.[5])

Weiterhin war hervorzuheben, wie dies Küster tat,[6]) daß die Natur der Oxydationskörper des Hämins nicht notwendig nur für die Pyrrolkonstitution des Hämopyrrols sprach, daß vielmehr die Bildung der Hämatinsäure aus dem Hämin auch durch die Annahme eines Hexahydroisoindolskelettes in der Molekel des Blutfarbstoffs erklärt werden kann. Diese Ansicht erwies sich jedoch als wenig wahrscheinlich, da es Marchlewski

---

[1]) Atti R. Accad. dei Lincei Roma [5] 13 I, 489.
[2]) Bér. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 2470, 1904.
[3]) Bull. intern. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1901.
[4]) Bull. intern. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1904, 1.
[5]) Bull. intern. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1906, 13.
[6]) Zeitschr. f. angew. Chem. 19, Heft 6.

mit Goldmann und später mit Hetper gelang nachzuweisen, daß Hämopyrrol leicht mit Diazoniumsalzen nach Art eines echten Pyrrols zu reagieren vermag. Die genannten haben gezeigt, daß Hämopyrrol mit Benzoldiazoniumchlorid als Hauptprodukt einen Farbstoff liefert, dessen chlorwasserstoffsaures Salz bei der Analyse Resultate gab, welche am besten mit der Formel $C_{20}H_{22}N_5Cl$ übereinstimmten; derselbe war also als ein Disazofarbstoff anzusehen. Daraus folgte nun ohne weiteres, daß Hämopyrrol jedenfalls weder Hexahydroindol noch Hexahydroisoindol sein kann; außerdem schien es sehr wahrscheinlich, daß es mindestens zwei Kernwasserstoffe frei hat und demnach entweder Diäthyl- oder Methylpropyl- oder Butylpyrrol sein könnte.

Überraschende Resultate erhielt dann Küster beim erneuten Studium der Oxydationsprodukte des Hämopyrrols, sowie auch beim Studium seines Verhaltens Säuren gegenüber. Er wies zunächst nach, daß Hämopyrrol sich in zwei verschiedene Teile zerlegen läßt, von denen der eine stärker basisch als der andere ist, und zweitens, daß jede dieser Hämopyrrolfraktionen bei der Oxydation wider alles Erwarten Methyläthylmaleinsäureimid liefert.[1])

Was zunächst die besagte Spaltbarkeit des Hämopyrrols bzw. seine Inhomogenität anbelangt, so haben Marchlewski und Mostowski[2]) dem Küsterschen Resultat auf Grund eigener Versuche eine andere Deutung gegeben. Nach diesen können die Küsterschen Versuche weder für noch gegen die Einheitlichkeit des Hämopyrrols sprechen; denn es gelang nachzuweisen, daß Hämopyrrol unter dem Einfluß von wässerigen Säuren verändert wird, und zwar derartig, daß es nach der Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure die Eigenschaft verliert, dasselbe Hämopyrroldisazodibenzol zu liefern wie ursprünglich.

Das zweite Küstersche Resultat war mit den Befunden der analytischen Untersuchungen des Hämopyrroldisazodibenzolchlorhydrates nicht in Einklang zu bringen. Mit Hetper und Goldmann[3]) hat einer von uns die folgenden analytischen

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 2017 (1907).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 464, 1907.

[3]) Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie 1905, 279.

Resultate erhalten, welche, wie ersichtlich, viel besser mit der Annahme übereinstimmen, daß Hämopyrrol Methylpropylpyrrol ist, als daß es Methyläthylpyrrol sei:

	Gefunden	Ber. für $C_{20}H_{22}N_5Cl$	Ber. $C_{19}H_{20}N_5Cl$
C	65,27	65,25	64,43
H	7,01	6,03	5,71
N	18,47	19,08	19,84
Cl	8,83	9,64	10,02
	99,58	100,00	100,00

Um die bestehenden Widersprüche aufzuklären, haben wir die Reaktion zwischen Hämopyrrol und Diazoniumsalzen einem erneuten Studium unterworfen. Das Resultat ist kurz folgendes. Das Hauptprodukt der Reaktion ist übereinstimmend mit den früheren Befunden entsprechend der Formel $C_{20}H_{22}N_5Cl$ zusammengesetzt. Außer diesem Produkt erhält man stets noch drei andere. Auf eines derselben haben bereits früher Marchlewski, Hetper und Goldmann aufmerksam gemacht; es ist dies eine wunderbar krystallisierende Substanz von rubinroter Farbe. Neu entdeckt wurden: eine in sehr geringer Menge auftretende Substanz, deren Chlorhydrat in grünen Nädelchen krystallisiert, und eine in wechselnden Mengen auftretende, in rotvioletten Nadeln krystallisierende.

Demnach muß geschlossen werden, daß das Hauptprodukt des Hämopyrrols in der Regel ein Pyrrolhomologes von der Formel $C_8H_{13}N$ und nicht $C_7H_{11}N$ ist. Andererseits ist es wenig wahrscheinlich, daß sämtliche vier isolierte Substanzen in genetischer Beziehung zueinander stehen, und es wird daher auch die Annahme der Inhomogenität durch die obigen Resultate unterstützt, welche die Küsterschen Versuche unserer Ansicht nach nicht beweisen konnten.

Experimentelles.

Die Darstellung des Hämopyrrols geschah nach der bekannten Methode von Nencki und Zaleski, welche auf der Reduktion des Hämins mit Jodwasserstoffsäure in essigsaurer Lösung bei Anwesenheit von Jodphosphonium beruht. Die Reduktion wurde jedesmal bei Anwendung von 5 g Hämin, 100 g Jodwasserstoffsäure und ca. 8 g Jodphosphonium ausgeführt. Das durch Destillation der verdünnten und neutralisierten

Reduktionsflüssigkeit gewonnene Hämopyrrol wurde sodann aus dem wässerigen Destillat mit 500 ccm Äther extrahiert und auf die bereits früher beschriebene Art mit Benzoldiazoniumchlorid behandelt. Auf aus 5 g Hämin gewonnenem Hämopyrrol kamen 50 ccm einer $^n/_5$-salzsauren Anilinlösung. Die ätherische Losung des Hämopyrrols nimmt bei der Behandlung mit der Diazoniumlösung sofort eine braunviolette Farbe an, die nach und nach immer intensiver wird. Sobald die Reaktion als beendet angesehen werden konnte und bereits im Scheidetrichter, in welchem die Kuppelung vorgenommen wurde, eine Abscheidung von Krystallen beobachtet werden konnte, wurde die wässerige Lösung abgelassen und die ätherische der Krystallisation überlassen. Die abgelassene wässerige Lösung zeigte beim Prüfen mit alkalischer R-Salzlösung oder Resorcin stets die Anwesenheit von unverbrauchtem Diazoniumsalz.

Auch in diesem Falle wurde beobachtet, daß als erstes Reaktionsprodukt des Hämopyrrols und Benzoldiazoniumchlorids eine orangegelbe Verbindung in Form von Nadeln abgeschieden wird, die jedoch sehr bald weiteren Umwandlungen unterliegt.

Nach 24stündigem Stehen wurden die aus der ätherischen Lösung abgeschiedenen Krystalle abfiltriert und das Filtrat durch Destillation auf die Hälfte konzentriert. Diese erste Mutterlauge gab eine weitere Abscheidung von Krystallen, die der Hauptsache nach mit denen der ersten Abscheidung identisch zu sein schienen. Durch Konzentrieren der zweiten Mutterlauge wurde wiederum eine Abscheidung von Krystallen beobachtet, die jedoch im Vergleich mit den beiden vorhergehenden weniger einheitlich erschien. Die dritte Mutterlauge gab nach dem Konzentrieren eine Abscheidung von den unten zu beschreibenden rubinroten Krystallen, während das Filtrat von den letzteren bei weiteren Konzentrationen eine Abscheidung von grünen feinen Nädelchen ergab. Die Mutterlauge der grünen Nadeln endlich gab beim Verdampfen eine klebrige, braunschwarze Masse, aus welcher nichts Krystallisierendes zu isolieren war.

Im ganzen wurden in diesem Falle aus 50 g Hämin 3,67 der am schwersten in Äther löslichen Krystalle erhalten (Produkt I), 0,21 der rubinroten Krystalle (Produkt II), 0,040 g eines Mischproduktes und 0,0322 g der grünen Nadeln (Produkt III), sämtliche Produkte im ungereinigten Zustande gewogen.

Unter dem Mikroskop betrachtet, erschienen bereits diese Rohfraktionen in der Regel ziemlich einheitlich. Einigemal erhielten wir aber auch ein abweichendes Resultat; die in Äther am wenigsten löslichen Produkte erschienen auf den ersten Blick uneinheitlich, und die mikroskopische Untersuchung ließ mit Leichtigkeit die Anwesenheit von 2 Krystalltypen entdecken, von denen der eine identisch mit dem Produkt I war, während der zweite eine früher nicht beobachtete neue Substanz darstellte (Produkt IV).

Produkt I.

Dasselbe ist in der Regel der Hauptsache nach Hämopyrroldisazodibenzolchlorhydrat, welches bereits früher beschrieben wurde.

Die Reingewinnung dieses Chlorhydrats gelingt leicht durch Krystallisation des Rohproduktes aus siedendem Alkohol. Die Lösungen müssen behufs rascher Krystallisation ziemlich konzentriert hergestellt werden. Besonders rasch erfolgt die Krystallisation aus einem Gemisch von Alkohol und Äther. Man arbeitet am zweckmäßigsten in der Art, daß man eine ziemlich konzentrierte alkoholische Lösung mit Äther versetzt. Das Produkt krystallisiert in schönen braunroten Nadeln, welche Metallglanz besitzen, und welche nach Morozewicz wie folgt charakterisiert werden können.

„Im auffallenden Lichte erscheinen die Krystalle goldglänzend. Der allgemeine Charakter: lange, zerbrochene Nadeln; einzelne Exemplare schräg zugespitzt. Im durchfallenden Lichte erscheinen sie braun. Dicke Exemplare zerstreuen das Licht bedeutend. Bei dünnen Exemplaren wurde eine schräge Auslöschung konstatiert, deren Winkel in bezug auf die Längenrichtung der Krystalle etwa 10° beträgt. Pleochroismus: c — dunkel, a — braunrot.[1]) Die Polarisationsfarbe ist blutrot. Die Krystalle gehören entweder dem monoklinen oder dem triklinen System an."

Der Schmelzpunkt wurde, übereinstimmend mit früheren Angaben, bei 233° gefunden.

Bei der Analyse der bei 105° sorgfältig getrockneten Prä-

[1]) a senkrecht zu c; c in Bezug auf Längenrichtung um 10° geneigt.

parate, welche dabei, wie konstatiert wurde, keine sauren oder basischen Dämpfe abgeben, wurden folgende Werte erhalten:

1. 0,1360 g gaben 0,3280 g CO_2 und 0,0842 g H_2O, entsprechend 65,77% C, 6,87% H.
2. 0,1192 g gaben 0,2871 g CO_2 und 0,0735 g H_2O, entsprechend 65,69% C, 6,91% H.
3. 0,1407 g gaben 0,0530 g AgCl, entsprechend 9,30% Cl.
4. 0,1000 g gaben 16,8 ccm N, (über NaOH) $t = 18{,}5$, $b = 730$ mm, entsprechend 18,77% N.
5. 0,1166 g gaben 19,0 ccm N, (über NaOH) $t = 19$, $b = 736$ mm, entsprechend 18,79% N.
6. 0,1319 g gaben 21,4 ccm N, (über H_2O) $t = 14$, $b = 710$ mm, entsprechend 17,73% N.
7. 0,0960 g gaben 15,9 ccm N, (über H_2O) $t = 17°$, $b = 724$ mm, entsprechend 18,29% N.

Im Mittel C: 1. 65,77 / 2. 65,69 / 65,73%
H: 1. 6,87 / 2. 6,91 / 6,89%
N: 1. 18,77 / 2. 18,79 / 3. 17,73 / 4. 18,29 / 18,39

	Gefunden	Ber. für $C_{20}H_{22}N_5Cl$	Ber. für $C_{19}H_{20}N_5Cl$
C:	65,73%	65,25%	64,43%
H:	6,89 „	6,03 „	5,71 „
N:	18,39 „	19,08 „	19,84 „
Cl:	9,30 „	9,64 „	10,02 „
	100,31%	100,00%	100,00%

Wie ersichtlich, stimmen die erhaltenen Werte auch diesmal viel besser mit der Formel $C_{20}H_{22}N_5Cl$. Die Formel $C_{19}H_{20}N_5Cl$, welche unter der Voraussetzung abgeleitet wurde, daß Hämopyrrol die Formel $C_7H_{11}N$ besitzt, also Methyläthylpyrrol sei, erscheint ausgeschlossen.

Den bereits publizierten Angaben bezüglich der Eigenschaften des Hämopyrroldisazodibenzolhydrochlorids haben wir nicht viel beizufügen. Durch Alkaliwirkung wird das Hydrochlorid leicht zersetzt unter Bildung des freien Azofarbstoffes, welcher aus verdünntem Alkohol ziemlich leicht krystallisiert.

Mit der Durchanalysierung desselben sind wir noch beschäftigt. Über die krystallographischen Verhältnisse des Azofarbstoffes hat Prof. Morozewicz die folgenden Angaben gemacht.

„Im reflektierten Lichte erscheinen die Krystalle blutrot. Im durchgehenden Lichte sind die meisten Individuen vollkommen undurchsichtig. Kurze Säulen, welche am häufigsten an einem Ende schräg abgeschnitten sind. Die schräge Fläche bildet mit der Längsachse der Krystalle einen Winkel von 124° bzw. 56°. Mitunter treten beiderseitig zugespitzte Individuen auf. Infolge der nahezu vollständigen Undurchsichtigkeit der Krystalle ist eine nähere Charakteristik derselben undurchführbar. Sie gehören jedoch jedenfalls dem mono- oder triklinen System an."

Bei der spektroskopischen Untersuchung des freien Farbstoffes in ätherischer Lösung wurden folgende Verhältnisse bemerkt:

Konzentration: 1 ccm = 0,000005 g

Absorption des Rots bis λ 732

Band λ 563,5—471

Innerhalb des Bandes ist ein Dunkelheitsminimum zu beobachten.

Endabsorption von λ 410 an.

Konzentration: 1 ccm = 0,000003 g

Absorption des Rots bis λ 733

Band I λ 557—530,5

„ II λ 519—495

Endabsorption von λ 405 an.

Konzentration: 1 ccm = 0,00002 g

Absorption des Rots bis λ 736

Band I λ 548,5—536,5

„ II λ 516—501,5

Konzentration: 1 ccm = 0,000015 g

Band I λ 548—540,5

„ II λ 514—503

Das Hydrochlorid verursacht im Spektrum nur ein Band auf der Thalium-Linie.

Interessant sind die komplexen Metallsalze des Hämopyrroldisazodibenzols. Dieselben entstehen leicht beim Mischen seiner kochenden alkoholischen Lösung mit den alkoholischen wässerigen

Lösungen verschiedener Metallsalze. Das mit Kupferazetat erzeugte Salz ist blau gefärbt, dasjenige mit Uranazetat ebenfalls blau. Die komplexen Salze sind in Äther leicht löslich und erzeugen im Spektrum charakteristische Absorptionen.

Kupferazetatsalz.

Konzentration: 1 ccm = 0,00014 g
Absorption des Rots bis λ 720
Band λ 661—541
Endabsorption λ 420

Konzentration: 1 ccm = 0,000091 g
Absorption des Rots bis λ 724
Band I λ 612—562
„ II λ 587—582

Konzentration: 1 ccm = 0,000061 g
Band I kaum sichtbar
„ II 586,5—582

Uranazetatsalz.

Konzentration: 1 ccm = 0,00014 g
Absorption des Rots bis λ 689
Band λ 650,5—522,5
Endabsorption bei ca. λ 400

Konzentration: 1 ccm = 0,000091 g
Absorption des Rots bis λ 721
Band λ 630—542

Konzentration: 1 ccm = 0,000061
Band λ 609—554
Innerhalb desselben ist ein Dunkelheitsmaximum
von λ 588—580
zu bemerken.

Konzentration: 1 ccm = 0,00004 g
Band λ 587—581.

Produkt II.

In den Mutterlaugen vom Chlorhydrat des Hämopyrroldisazodibenzols befindet sich ein Körper, welcher sich sehr auf-

fallend von jenem unterscheidet. Er läßt sich von ersterem leicht auf Grund seiner Schwerlöslichkeit in Alkohol vollständig trennen und kann behufs endgültiger Reinigung aus einem Gemisch von Chloroform und Alkohol krystallisiert werden. Die Krystallisation wird am einfachsten in der Art bewerkstelligt, daß das Rohprodukt zunächst mit kleinen Mengen von Alkohol ausgekocht, sodann in heißem Chloroform gelöst und durch Zusatz von Alkohol abgeschieden wird. Aus der noch warmen Lösung scheiden sich prächtig schillernde rubinrote Krystalle ab, die auf einem gehärteten Filter gesammelt werden und nach dem Waschen mit Alkohol und Äther und Trocknen bei 105° zur Analyse gelangen können. Leider haben wir von dieser Substanz nur geringe Mengen unter den Händen gehabt. Der Schmelzpunkt dieser Substanz liegt bei 268°. Sie löst sich in Chloroform mit blauvioletter Farbe auf, siedender Alkohol nimmt nur Spuren mit blauer Farbe auf; auch in Äther ist die Substanz schwer löslich.

Über die krystallographischen Verhältnisse dieses Produktes machte uns Herr Prof. Morozewicz folgende Angaben: „Die Farbe der Krystalle im reflektierten Lichte ist amarantviolett, im durchfallenden prächtig dunkelsmalteblau. Längliche, flache Säulen, welche häufig eine Schwalbenschwanzbegrenzung haben; manche Krystalle sind gerade abgeschnitten. Zwischen gekreuzten Nicols werden sie gerade verdunkelt. Die senkrechte Achse (*z*) fällt mit der Achse der kleinsten optischen Elastizitätsachse zusammen. Pleochroismus hervorragend: parallel zu *z* smalteblau, senkrecht zu *z* schwarz. Die Krystalle gehören dem rhombischen Systeme an."

Die Analysen gaben folgende Resultate:

1. 0,1036 g gaben 0,2598 g CO_2 und 0,0613 g H_2O,
   entsprechend 68,39% C
   und 6,57% H.

2. 0,1180 g Substanz gaben 18,4 ccm N (über Wasser) bei $t = 18°$, $b = 743$ mm,
   entsprechend 17,52% N.

3. 0,1027 g gaben 16,5 ccm N (über Wasser) bei $t = 17°$, $b = 734{,}6$ mm,
   entsprechend 18,09% N.

Gefunden im Mittel		Ber. f. $C_{23}H_{27}N_5O_2$
C:	68,39%	68,14%
H:	6,57%	6,66%
N:	17,80%	17,28%
O:	7,24%	7,92%
	100,00%	100,00%

Die gefundenen Werte stimmen, wie ersichtlich, gut mit der Formel $C_{23}H_{27}N_5O_2$ überein, welche jedoch vorläufig mit Vorbehalt angeführt wird. Dieselbe wird unter der Annahme berechnet, daß das Produkt chlorfrei ist, welche sich hauptsächlich auf der Beobachtung stützt, daß bei der Prüfung auf Halogen nach der bekannten Flammenreaktion eine nur sehr schwache Grünfärbung wahrgenommen wurde, welche allerdings durch Spuren einer Verunreinigung verursacht werden konnte. Nimmt man an, daß die Substanz doch Chlor als konstituierenden Bestandteil enthält, so berechnet sich etwa die Formel $C_{27}H_{31}N_6Cl$, welche verlangt: 68,28% C, 6,53% H, 17,70% N, 7,48% Cl- Die Chloroformlösung dieses Produktes verursacht im weniger gebrochenen Teil des Spektrums zwei Bänder.

Konzentration 1 ccm = 0,000103
Absorption des Rots bis λ 622
Band I λ 571,5—556,5
„ II λ 531,5—511,0
Konzentration 1 ccm = 0,0000686
Absorption des Rots bis λ 638,5
Band I λ 569,0—557,5
„ II λ 528,0—513,0
Konzentration 1 ccm = 0,0000464
Absorption des Rots bis λ 650
Band I λ 563,5—559,0
„ II λ 524,0—516,5

Produkt II besitzt ebenfalls die Fähigkeit, komplexe Metallsalze zu bilden, die jedoch eine unschöne braune Farbe aufweisen. Die Darstellung derselben erfolgt in der Art, daß die Chloroform-Alkohol-Lösung des Produktes mit der alkoholischen Lösung der Metallazetate versetzt wurde. Das Gemisch wurde auf dem Wasserbade erwärmt, das Lösungsmittel verdampft

und der Rückstand in Äther aufgenommen. Untersucht wurde das Kupfer und Uransalz.

Kupferazetatsalz.

Konzentration entsprechend 0,000137 g Produktes II pro 1 ccm.
Absorption des Rots bis λ 698
Band I λ 605,0—572,5
Endabsorption λ 525

Konzentration entsprechend 0,0000913 g Produktes II pro 1 ccm.
Absorption des Rots bis λ 707
Band I λ 602—574
Endabsorption λ 510

Konzentration entsprechend 0,0000406 g Produktes II pro 1 ccm.
Absorption des Rots bis λ 721,5
Band I kaum sichtbar
„ II λ 496,0—475,5

Konzentration entsprechend 0,000027 g Produktes II pro 1 ccm.
Band I unsichtbar
„ II λ 494,5—479

Uranazetatsalz.

Dasselbe verhält sich dem Kupfersalz ganz analog. In konzentrierteren Lösungen ist außer der Absorption eines Teiles des Rots am Infrarot und der Endabsorption nur ein Band vorhanden. Je nach der eingehaltenen Konzentration entspricht die Lage des ersten Bandes den folgenden Wellenlängen:

Band I λ 606,5—571,0
;, I λ 603,0—574,5
„ I λ 595,5—576
„ I λ 588 —580 sehr matt.

Bei der Konzentration, welche durch die letzt angeführten Wellenlängen des ersten Bandes charakterisiert ist, tritt bereits ein zweites Band auf:

Band II λ 492,5—472

Bei weiterer Verdünnung verschwindet das erste Band gänzlich, und das zweite Band entspricht den folgenden Wellenlängen:

$$\lambda\ 491{,}5 - 476{,}0.$$

Erwähnt mag endlich noch werden, daß Produkt II auch im Ultraviolett ein charakteristisches, aus zwei Bändern bestehendes Spektrum zeigt. Das erste, starke Band liegt auf der Hg $= 404{,}7\ \mu\mu$-Linie, das zweite, äußerst matte ungefähr zwischen jener Linie und dem Hg-Triplet 366,3, 365,5, 356,0 $\mu\mu$.

Was die Natur des Produktes II anbelangt, so ist dieselbe vorderhand noch völlig unklar. Bezeichnend ist jedoch die Tatsache, daß das synthetische $\alpha\beta_1$-Dimethylpyrrol eine ganz analoge Verbindung mit Diazoniumsalzen bildet. Äußerlich sind beide Substanzen kaum zu unterscheiden. Auch sind die Absorptionsverhältnisse beider Körper im weniger gebrochenen Teil des Spektrums ganz analog. Nur im Ultraviolett wurde ein Unterschied beobachtet. Während nämlich Produkt II aus Hämopyrrol, wie gesagt, zwei Bänder verursacht, von denen das eine viel intensiver ist als das andere, zeigt das aus Dimethylpyrrol gewonnene Produkt zwei Bänder von annähernd derselben Intensität. Das eine liegt zwischen der Hg-Linie $= 435{,}8\ \mu\mu$ und $404{,}7\ \mu\mu$, das andere auf letzterer Linie. Das in Rede stehende Dimethylpyrrolderivat wird gegenwärtig ausführlich untersucht. Über das Ergebnis dieses Studiums soll später ausführlich berichtet werden.

Produkt III.

Dieses Produkt entsteht in so geringen Mengen, daß wir von einer genaueren Untersuchung desselben Abstand nehmen mußten. In Form des Chlorhydrates krystallisiert es in schönen grünen Nädelchen, die starken Glanz besitzen. Sie schmelzen noch nicht bei 300°. In Alkohol in der Wärme lösen sie sich ziemlich leicht mit rötlich-violetter Farbe, in Äther sind sie äußerst schwer löslich. Durch Alkalizusatz wird der freie Farbstoff abgeschieden, welcher in organischen Solvenzien leicht löslich ist. Die Farbe seiner Lösungen ist blaustichiger als die des Produktes II. Im Spektrum erzeugt die ätherische Lösung des Farbstoffes zwei Bänder, welche durch folgende Wellenlängen charakterisiert sind:

Band I λ 601,0 — 573,0
Band II λ 560,0 — 536,0

Das allgemeine Verhalten dieses Produktes spricht dafür, daß es dem Produkt I viel näher steht als dem Produkt II.

Produkt IV.

Bei einigen Darstellungen des Hämopyrroldisazodibenzolchlorhydrates wurde bemerkt, daß bereits die ersten Krystallausbeuten inhomogen waren. Außer den helleren Krystallen des Produktes I wurden dunkel rotbraune Nadeln beobachtet, welche einen anderen Krystallhabitus aufwiesen.

Wurde dieses Gemisch aus Alkohol umkrystallisiert, so erhielt man ein Produkt, in welchem das Chlorhydrat des Hämopyrroldisazodibenzols an Menge zwar zurücktrat, aber dennoch in ansehnlicher Quantität vorhanden war. Der Schmelzpunkt derartiger Präparate variierte zwischen 180 und 183°. Häufige Krystallisationen änderten an der Sachlage nicht viel, eine mikroskopische Untersuchung überzeugte uns sofort, daß die gewonnenen Präparate stets Gemische von zwei verschiedenen Körpern waren. Es gelang jedoch auf folgende Art, eine vollständige Trennung des Produktes I vom Produkte IV zu erzielen. Wird das Gemisch auf dem Filter mit kleinen Mengen kalten Chloroforms behandelt, so löst sich Produkt IV, während die Hauptmenge des Produktes I ungelöst zurückbleibt. Letzteres zeigte ohne weitere Reinigungen nahezu den korrekten Schmelzpunkt (233°). Die Chloroformlösung wurde nun mit Petroleumäther vom Siedep. 27° versetzt, wobei Produkt IV in amorphen Flocken niedergeschlagen wird. Im Filtrat von letzterem scheint noch ein anderer Körper von roter Farbe vorhanden zu sein. Der erwähnte, durch Petroleum erzeugte Niederschlag wurde nun zweimal aus siedendem Alkohol umkrystallisiert, wobei dunkelrotbraune, undurchsichtige, spitze, schmale Säulen erhalten wurden, welche konstant bei 185 bis 186° schmolzen. Das Produkt wurde bei 105° getrocknet und analysiert.

1. 0,1278 g gaben 0,3076 CO_2 und 0,0810 g H_2O,
   entsprechend 65,74 % C,
   7,04 % H,
2. 0,1380 g gaben 0,0508 g AgCl,
   entsprechend 9,10 % Cl.

3. 0,1138 g gaben 0,2735 g CO_2 und 0,0650 g H_2O,
entsprechend 65,55 % C,
6,34 % H,
4. 0,1070 g gaben 14,5 ccm N (über Wasser)
bei t = 17°, b = 746,6 mm,
entsprechend 15,37 % N.
5. 0,1138 g gaben 14,65 ccm N, t = 14°, b = 718 mm
entsprechend 14,23 % N.

Leider hatten wir nicht genug Substanz zur Verfügung, um noch eine Stickstoffbestimmung auszuführen, welche in Anbetracht der ziemlich starken Differenz der zwei erhaltenen Werte wünschenswert erschien. Die erhaltenen Resultate sprechen aber doch entschieden gegen die Annahme, daß das Chlorhydrat des Produktes IV mit dem des Produktes I isomer sei, was aus der Übereinstimmung der C-, H- und Cl-Werte geschlossen werden könnte. Die obwaltenden Verhältnisse werden durch die folgende Zusammenstellung übersichtlicher:

	Produkt I	Produkt IV
C:	65,73 %	65,59 %
H:	6,89 %	6,69 %
N:	18,39 %	14,82 %
Cl:	9,30 %	9,10 %

Sollten weitere Studien die obigen N-Werte bestätigen. so würde folgen, das Produkt IV im Gegensatz zu Produkt I sauerstoffhaltig ist. Bemerkt muß jedoch werden, daß wir die zur Analyse bestimmten Proben vorderhand nur bei 105° trockneten. Höheres Erhitzen erschien riskant, da die Substanz eine kleine Menge saurer Dämpfe abgab. In spektroskopischer Beziehung unterscheidet sich Produkt IV sehr unbedeutend von Produkt I.

Bei der Untersuchung der spektralen Eigenschaften des freien Farbstoffs, welcher durch Alkaliwirkung sofort aus dem Chlorhydrat entsteht, wurden folgende Werte erhalten:

Lösungsmittel: Äther.
Konzentration entsprechend 0,000073 g Chlorhydrat pro 1 ccm.
Absorption des Rots bis λ 737
Band λ 562—454
Endabsorption λ 410

Konzentration entsprechend 0,000048 g Chlorhydrat pro 1 ccm.

Absorption des Rots bis λ 733

Band λ 553—471

Konzentration entsprechend 0,000032 g Chlorhydrat pro 1 ccm.

Band λ 548—481

Bei weiterer Verdünnung wird das beobachtete Band in zwei gespalten:

Konzentration 0,000022 g Chlorhydrat pro 1 ccm.

Band I λ 547—539

„ II λ 519—496

Konzentration 0,000014 g Chlorhydrat pro 1 ccm.

Band I λ 547—541

„ II λ 517—497

Wie ersichtlich, ist dieses Spektrum dem des Produktes I sehr ähnlich. Die Bänder sind jedoch bei jenem besser begrenzt. Mit Metallsalzen liefert Produkt IV ebenfalls komplexe Salze. Das Kupferazetatsalz ist blau-violett, das Uranazetatsalz blau. Genauer wurde nur das Uransalzspektrum untersucht. In stärkeren Konzentrationen zeigen die ätherischen Lösungen nur ein Band, welches je nach der Konzentration folgende Wellenlängen einnimmt:

Band λ 643—519,5

„ λ 623—541

Bei stärkeren Verdünnungen wird dieses Band gespalten:

Band I λ 611—593,5

„ II λ 586,5—578,5

oder „ I λ 605—594

„ II λ 586,5—581

oder „ I λ 601—594,5

„ II λ 586,5—582,5

Das Studium der Hämopyrrolazoderivate wird fortgesetzt.

Auftreten von Formaldehyd bei der zellfreien Gärung.

Von

Alexander Lebedew, Moskau.

Vorläufige Mitteilung.

(Aus dem chemischen Laboratorium der landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 18. Mai 1908.)

Im Sommersemester 1907 habe ich kinetische Versuche über die Preßsaftgärung angefangen und zu diesem Zweck den Waltonschen Schüttelapparat[1]) in von mir etwas modifizierter Form angewandt. Bei diesen Versuchen machte ich die überraschende Beobachtung, daß, nachdem die Gärung zu Ende gegangen war, nunmehr, obwohl der Apparat Tag und Nacht geschüttelt wurde, die Reaktion umgekehrt verlief, d. h. Absorption des über dem gegorenen Preßsaft sich befindenden Kohlensäuregases stattfand. Diese Erscheinung konnte ich bei allen Versuchen wahrnehmen, und es wurden nicht selten bis zu 20 ccm, in einzelnen Fällen sogar noch mehr Kohlendioxyd von 20 ccm ursprünglich angewendeten Preßsaft verschluckt, wie man es z. B. aus folgenden Zahlen sehen kann.

1. Versuch. 2 Kölbchen mit je 20 ccm Preßsaft und 4 ccm 10 %iger Traubenzuckerlösung + 0,2 ccm Tolnol. Ferner 2 Kölbchen zur Beobachtung der Selbstgärung des Preßsaftes, enthaltend je 20 ccm Preßsaft ohne Zuckerzusatz, aber mit 4 ccm Wasser verdünnt. Nach der vollendeten Gärung wurde beobachtet, wieviel Kohlendioxyd absorbiert werde.

In den 2 Kölbchen ohne Zuckerzusatz wurde 1 resp. 1,5 ccm Kohlendioxyd, in den beiden mit Zuckerzusatz 28 resp. 30 ccm verschluckt.

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 47, 185, 1904.

2. Versuch. Dieselben Bedingungen. In 2 Kölbchen ohne Zuckerzusatz wurde 1 resp. 0,6 ccm, in 2 Kölbchen mit Zucker 22,7 resp. 22,6 ccm Kohlendioxyd absorbiert.

Da der Apparat auf seine Dichtigkeit sorgfältig untersucht worden ist, sind Versuchsfehler vollkommen ausgeschlossen. Ebenso unmöglich ist es, daß die Sperrflüssigkeit (Wasser) so viel Kohlendioxyd absorbieren konnte, weil erstens immer mit demselben Wasser gearbeitet wurde, und zweitens bei den Kontrollversuchen mit geschlossenem Hahn, oder mit durch Klemmschraube zusammengedrückter Gummischlauchverbindung zwischen dem Capillarrohr und dem Kolben — wobei also die Gärkölbchen ausgeschaltet waren — sich zeigte, daß innerhalb 24 Stunden nur ungefähr 1 ccm Kohlendioxyd von dem Wasser verschluckt wurde.

Übrigens läßt sich die starke Absorption des Gases auch bei den gewichtsanalytischen Bestimmungen der Gärkraft im Erlenmeyerkölbchen mit Meißlschem Gärverschluß im Thermostaten beobachten; man sieht nämlich, wie nach beendeter Gärung die Schwefelsäure bedeutend in den inneren Teil des Gärventils, unter Umständen sogar bis in den Kolben selbst hineingezogen wird.

Die oben beschriebene Beobachtung beim Arbeiten mit dem Waltonschen Apparat ließ mich vermuten, da die Reaktion der Gärflüssigkeit neutral oder etwas sauer blieb, daß in dem Preßsafte eine Zuckersynthese stattfinden müßte, d. h. also, daß auch bei der zellfreien Gärung eine Reversion des Prozesses vor sich geht, wie dies für andere enzymatische Vorgänge nachgewiesen ist.

Ich habe nun zunächst Versuche ausgeführt, um festzustellen, ob der Preßsaft aus Alkohol und Kohlensäure Zucker zu synthetisieren vermag. Zu dem Zwecke leitete ich mehrere Tage lang ununterbrochen Kohlensäure durch alkoholhaltigen, glykogenfreien Preßsaft und führte dann alle 2—3 Tage Zuckerbestimmungen aus. Jeder Versuch dauerte mehr als drei Wochen, es ließ sich aber Zuckerbildung mit Sicherheit nicht nachweisen; dagegen konnte ich konstatieren, daß ein Polysaccharid des Preßsaftes fortwährend gespalten wird und dabei die Menge des reduzierenden Zuckers wächst.

Nachdem diese Versuche keinen Beweis für die Richtigkeit

meiner Annahme geliefert hatten, stellte ich Gärversuche mit Preßsaft unter Zuckerzusatz (aber ohne Alkohol) an und bestimmte sowohl während der Gärung wie nach Beendigung derselben den Zuckergehalt des gegorenen Saftes. Parallel hiermit machte ich mit Hilfe des genannten Apparates volumetrische Kohlensäurebestimmungen. Über die hierbei gewonnenen Resultate wird später in dieser Zeitschrift berichtet werden, wobei auch auf die Natur des Polysaccharids eingegangen werden soll.[1]) Außer den beiden Gärkölbchen befanden sich zwei weitere Kölbchen in dem Apparat, die nur mit Preßsaft beschickt, also ohne Zuckerzusatz geblieben waren; nur in denjenigen Fällen, wo infolge des vorhandenen Zuckers lebhafte Gärung eintrat, zeigte sich dann am Schlusse die Erscheinung der Absorption der Kohlensäure besonders auffällig.

Nach einer Ursache für dies rätselhafte Verschwinden des Kohlendioxyds suchend, kam mir der Gedanke, daß bei der Gärung vielleicht Kohlensäure zu Formaldehyd reduziert werden und letzterer sich dann zu Biosen, Triosen usw. kondensieren könnte. Ich habe deshalb die für die erwähnten Zuckerbestimmungen verwendeten Proben des Preßsaftes jedesmal daraufhin untersucht und zu meinem Erstaunen Formaldehyd wirklich nachweisen können. Die Reaktionen waren dann besonders stark, wenn der Preßsaft am wenigsten reduzierenden Zucker enthielt; vor und nach diesem Zeitpunkt fiel die Formaldehydreaktion um so schwächer aus, je mehr reduzierender Zucker vorhanden war. Die ausgeführten Niederschlagsreaktionen auf Formaldehyd waren folgende: mit Dimethylhydroresorcin[2]); mit *p*-Nitrophenylhydrazin[3]); besonders schöne Reaktionen auf Formaldehyd sind die mit Dimethylanilin[4])

[1]) Hier sei vorläufig nur darauf hingewiesen, daß die mit gärendem Preßsaft ausgeführten direkten Zuckerbestimmungen eine größere Geschwindigkeit für das Verschwinden des Zuckers ergeben haben, als sich aus den entwickelten Kohlensäuremengen berechnet.

Es scheint demnach, daß das Verschwinden des Zuckers und die Gärung zwei nebeneinander unabhängig verlaufende Prozesse (konsekutive Reaktionen) sind.

[2]) Vorländer und Kalkow, Lieb. Ann. 309, 356, 1899; Vorländer, Ibid. 294, 316, 1897.

[3]) Bamberger, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 1807, 1899.

[4]) Trillat, Compt. r. d. l'Acad. d. sciences 116, 891, 1893.

(wobei Tetramethyldiamidodiphenylmethan entsteht, welches in Berührung auf dem mit Essigsäure befeuchteten Filter mit Bleisuperoxyd eine intensive blaue Färbung infolge Bildung des Hydrols gibt), sowie die mit *p*-Dihydrazinodiphenyl.[1]) Selbstverständlich sind alle diese Reaktionen angestellt worden, nachdem die Eiweißkörper entfernt waren. Auch im Destillat konnte Formaldehyd nachgewiesen werden. Erwähnt sei noch, daß frischer Preßsaft nach Entfernung der Eiweißstoffe mit den angeführten Reagentien keine Niederschläge gab.

Nachdem somit vier der besten Reaktionen auf Formaldehyd ein positives Resultat ergeben haben, muß man daran denken, daß derselbe vielleicht bei der Gärung entsteht.

Es könnte sein, daß der Formaldehyd bei der Spaltung des Zuckers durch die Zymase auftritt, oder daß er ein Reduktionsprodukt der Kohlensäure ist, was bei den stark reduzierenden Eigenschaften des Preßsaftes[2]) möglich erscheint.

Die Fachgenossen bitte ich, diese Untersuchungen — sowohl die Zuckerbestimmungen während der Gärung, als auch die Klärung der Frage über das Entstehen des Formaldehyds — mir ungestört zu überlassen.

---

[1]) Neuberg. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 1963, 1899. — Hierbei wurde der Preßsaft nach Beseitigung der koagulierbaren Eiweißkörper mit 1 Vol. Äthylalkohol versetzt, um die Bildung von anderen Hydrazonen sicherer zu vermeiden.

[2]) Vgl. M. Hahn in E. und H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, München 1903, 341—349.

Über eiweißspaltende Enzyme im Säuglingsharn.

Von

Arnold Benfey.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Königl. Universitäts-Kinderklinik in Berlin. Direktor: Geheimrat Heubner.)

(Eingegangen am 19. Mai 1908.)

Das Vorkommen eiweißverdauender Enzyme im Urin ist seit langer Zeit bekannt. Aber die Verschiedenheit, die in den Resultaten der einzelnen Untersucher zutage tritt, ist so groß, daß man gezwungen ist, sie im wesentlichen auf eine Unzulänglichkeit der angewandten Methoden zurückzuführen. Wenigstens sprechen hierfür die beiden über Enzyme im Säuglingsurin vorliegenden Arbeiten.

Während Philips[1]) bei seinen in der Breslauer Kinderklinik angestellten Versuchen nicht einmal der Nachweis von Pepsin im Urin gelang — er bediente sich dazu der Mettschen Probe — konnte Borrino[2]) an derselben Klinik mit veränderter Methodik dieses Enzym im Säuglingsurin nachweisen, während ihre Versuche zum Nachweis von Trypsin negativ ausfielen. Die von ihr angewandte Methode ist von Mya und Belfanti[3]) angegeben. Frisch hergestellte und in reinem Glycerin aufbewahrte Rindsfibrinflocken werden in angesäuertem, ungekochtem Urin nach 8 bis 10 Std. ganz aufgelöst, während sie in gekochtem nur aufquellen. Der negative Ausfall der von Borrino angestellten Trypsinversuche ist wahrscheinlich, wie weiter unten näher ausgeführt werden soll, der Methodik zur Last zu legen.

---

[1]) Dr. Firmin Philips (Maeseyck, Belgien). Über Fermenttherapie beim Säugling. Monatschr. f. Kinderheilk. 5, Nr. 8. 1906.

[2]) Dr. Angiola Borrino (Turin), Proteolytische Fermente im Säuglingsurin. Monatsschr. f. Kinderheilk. 6, Nr. 4. 1907.

[3]) Arch. p. l. sc. med. 1886.

Auf dem 24. Kongreß für innere Medizin in Wiesbaden hat Brodzki[1]) eine neue Methode angegeben, mit der ihm der sichere Nachweis von tryptischem Ferment im Urin gelang. Die Methode beruht auf der Bestimmung des aus den verdauten Eiweißkörpern gebildeten, nicht koagulierbaren Stickstoffs.

Die Methodik ist folgende: 25 ccm von gut durchgemischtem Harn (Tagesmenge) werden mit 20 ccm destillierten Wassers versetzt; man nimmt einerseits ungekochten Harn, in dem eventuell vorhandene Enzyme wirksam sind, andererseits gekochten, in welchem diese durch das Kochen unwirksam gemacht sind. Die beim Kochen verdunstende Wassermenge (ca. 1 ccm) muß nachgefüllt werden. Nach Zusatz von 1 g Casein werden zur Prüfung auf peptisches Ferment 2 ccm $^n/_1$-Salzsäure, zur Prüfung auf tryptisches 2 ccm $^n/_2$-Natronlauge oder 2 ccm 1 % Natriumcarbonatlösung zugesetzt, und das Gemisch 24 Stunden im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Zusatz von ca. 1 ccm Toluol verhindert, wie Brodzki experimentell nachgewiesen hat, jede Störung der Probe durch Bakterienentwicklung.

Nach Entfernung der Erlenmeyerkölbchen aus dem Brutschrank werden ca. 5 g Chlornatrium und die zur Neutralisation nötige Menge von Normalsäure, bzw. Alkali zu dem Verdauungsgemisch gefügt, die Lösung auf freier Flamme bis ca. 70° erwärmt und das nicht verdaute Casein dann durch tropfenweisen Zusatz von 1 ccm Eisessig unter Schütteln ausgefällt, noch kurze Zeit zum besseren Zusammenballen auf dem Wasserbade erwärmt und durch ein Faltenfilter filtriert. Läuft die Lösung nicht gleich das erstemal klar durch, so müssen die filtrierten Flüssigkeitsmengen nochmals erhitzt auf das Filter zurückgegossen werden. In 10 ccm des Filtrates (genau 5 ccm Harn entsprechend) wird der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

Brodzki hat nun bei seinen Versuchen nachgewiesen, daß das Casein vom urotryptischen Fermente schnell angegriffen wird, daß Fibrin dagegen fast gar nicht verändert wird. Das Casein ist also für das Harntrypsin ein adäquates, das Fibrin ein nichtadäquates Substrat, während für das Harnpepsin, wie ein zweiter Versuch zeigt, Casein und Fibrin gleich adäquate Substrate sind. Hierdurch wird möglicherweise der negative Ausfall des Borrinoschen Trypsinnachweises (s. S. 458) erklärt.

Mit dieser Methode habe ich in 10 verschiedenen Urinen von gesunden und kranken Säuglingen Pepsin und Trypsin nachzuweisen versucht. In zwei Fällen (Fall 9 und 10) mußte ich allerdings auf den Trypsinnachweis verzichten, weil es mir

[1]) Über urotryptische Fermente. Zeitschr. f. klin. Med. 63, 1907.

nicht gelang, von dem alkalischen Verdauungsgemisch ein klares Filtrat zu erhalten. Das Erwärmen auf dem Wasserbade, das Brodzki zum besseren Zusammenballen des nicht verdauten Caseins empfiehlt, habe ich fortgelassen, da es zeitraubend ist und sich sein Vorteil nicht erweisen ließ.

Die bei meinen Versuchen gewonnenen Resultate registriert die folgende Tabelle.

		N-Gehalt in 10 ccm Filtrat vom		Differenz
		ungekochten Urin	gekochten Urin	
1. Walter Kott, 6 Mon. alt. Lues. Ernährung: Frauenmilch, $^1/_2$ Milch m. Grieß. Urintagesmenge: 220 ccm.	Pepsinversuch	14,1804	12,3552	1,8252
	Trypsinversuch	13,4784	12,2148	1,2636
2. Otto Teichert, 5 Mon. alt. Gesundes Ammenkind. Ernährung: Muttermilch. Urintagesmenge: 450 ccm.	Pepsinversuch	10,3896	7,1604	3,2292
	Trypsinversuch	8,9856	8,424	0,5616
3. Max Nemitz, 4 Mon. alt. Atrophie. Ernährung: Frauenmilch + Buttermilch. Urintagesmenge: 425 ccm.	Pepsinversuch	13,7592	9,828	3,9312
	Trypsinversuch	10,59	10,59	0
4. Max Finster, 1 Jahr alt. Rachitis. Ernährung: $^2/_3$ Milch-Grießbrei, Gemüse.	Pepsinversuch	19,3752	17,2692	2,106
	Trypsinversuch	19,7964	17,4096	2,3868
5. Ella Wilke, $6^1/_2$ Mon. alt. Ernährungsstörung. Ernährung: Malzsuppe. Urintagesmenge: 200 ccm.	Pepsinversuch	22,0428	19,656	2,3868
	Trypsinversuch	21,3408	19,656	1,6848
6. Alfred Scharafinski, 8 Mon. alt. Spasmophile Diathese. Ernährung: Rohe Milch, gem. Kost. Urintagesmenge: 400 ccm.	Pepsinversuch	34,5384	30,7476	3,7908
	Trypsinversuch	38,3292	36,2232	2,106

		N-Gehalt in 10 ccm Filtrat vom ungekochten Urin	N-Gehalt in 10 ccm Filtrat vom gekochten Urin	Differenz
7. Paul Lakotta, $6^1/_2$ Mon. alt. Gesundes Ammenkind. Ernährung: Muttermilch, Bouillon, Milch, Grieß, Mehl. Urintagesmenge: 425 ccm.	Pepsinversuch	27,6588	25,8336	1,8252
	Trypsinversuch	26,2548	25,272	0,9828
8. Bruno Wisniewki, $5^1/_2$ Mon. alt. Gesundes Ammenkind. Ernährung: Muttermilch, $^1/_2$ Milch, Grießbrei. Urintagesmenge: 600 ccm.	Pepsinversuch	23,868	22,0428	1,8252
	Trypsinversuch	23,868	23,0256	0,8424
9. Felix Radicke, 6 Mon. alt. Chron. Ernährungsstörung. Ernährung: $^2/_3$ Milch. Urintagesmenge: 380 ccm.	Pepsinversuch	24,5700	22,6044	1,9656
10. Alfred Neujocks, $4^1/_2$ Mon. alt. Lues. Ernährung: Amme. Buttermilch, Bouillon. Urintagesmenge: 225 ccm.	Pepsinversuch	24,9912	19,0944	5,8968

Es ließ sich, wie aus dieser Tabelle ersichtlich, ein dem Pepsin gleichwirkendes Ferment in jedem Falle im Säuglingsurin nachweisen. Denn der Stickstoffgehalt war im ungekochten Urin, in dem also die Fermente zur Wirkung gelangen konnten, gegenüber dem gekochten Urin im Mindestfalle (Fall 1, 7 und 8) um 1,8252 mg vermehrt, im Höchstfalle (Fall 10) um 5,8968 mg. Trypsin ließ sich dagegen nicht in allen Urinen nachweisen. Im Falle 3 war sicher keins vorhanden, die Differenz im N-Gehalt beträgt hier 0, aber auch Fall 2, 7 und 8 möchte ich, da die Differenzwerte zu gering sind, noch nicht mit Sicherheit als positiv ansehen; die übrigen Fälle dagegen mit der Mindestdifferenz von 1,2636 mg N (Fall 1) und der Höchstdifferenz von 2,3868 mg N (Fall 4) sprechen meiner

Meinung nach sicher für eine stattgehabte tryptische Verdauung.

Die von mir gefundenen Differenzwerte sind allerdings nicht so groß wie die von Brodzki für den Urin von Hunden, vom Kaninchen und vom gesunden Menschen angegebenen. Das findet aber seine Erklärung in der geringeren Konzentration der Säuglingsurine. Brodzki hat selbst nachgewiesen, daß der Harn um so weniger Fermente enthält, je verdünnter er ist.

Zwei Einwände ließen sich gegen die Methode erheben, die Brodzki nicht erwähnt hat: erstens, daß etwa aus dem alkalischen Verdauungsgemisch im Brutschrank Ammoniak entweicht. Das ist nicht der Fall. Ich habe dem alkalischen Gemisch ein Quantum $^n/_{10}$-Säure vorgelegt, habe es 48 Stunden im Brutschrank stehen lassen und durch Titration nachweisen können, daß keine Spur Säure neutralisiert wurde.

Ein zweiter Einwand hat dagegen etwas mehr Berechtigung. Das ist der, daß etwa beim Kochen eines von vornherein alkalischen Urins Ammoniak entweicht und dadurch eine Verringerung des N-Gehalts im gekochten Urin herbeigeführt wird. Dieser Einwand ist gerade bei Säuglingsurinen um so wichtiger, als hier häufig auch frische, klare Urine, z. B. bei Vollmichernährung, alkalisch reagieren. Tatsächlich entweicht nun aus solchen Urinen beim Kochen Ammoniak, wie ich mich durch das Blauwerden eines vorgelegten roten Lackmuspapieres überzeugen konnte. Aber die dadurch bewirkte Verminderung des N-Gehalts ist doch so gering, daß sie für die oben als positiv bezeichneten Fälle nicht in Betracht kommt. Ich habe von einem stark alkalischen Urin 25 ccm intensiv gekocht und dann nach Zusatz von 1 ccm destillierten Wassers (wie im Hauptversuche) den N-Gehalt nach Kjeldahl bestimmt. Er betrug 26,4 ccm Säureverbrauch, während ich für den ungekochten Urin 26,7 ccm Säureverbrauch fand, also eine Differenz (0,3), die beinahe noch in die gewöhnlichen Fehlergrenzen fällt.

Ich komme also zu dem Schluß:

Im Säuglingsurin kommt ein dem Pepsin und ein dem Trypsin gleichwirkendes Ferment vor.

Das Uropepsin ist mit größerer Regelmäßigkeit nachzuweisen als das Urotrypsin.

Über die quantitative Bestimmung einiger reduzierender Substanzen im Säuglingsharn.

Von

Roberto Funaro.

(Aus dem chemischen Laboratorium der königlichen Universitäts-Kinderklinik in Berlin. Direktor: Geheimrat Heubner.)

(Eingegangen am 19. Mai 1908.)

Der Urin enthält physiologischerweise kleine Mengen von reduzierenden Stoffen, die nicht leicht zu erkennen und zu bestimmen sind. Mit einer neuen Methode hat Hilding Lavesson[1]) einige von diesen im menschlichen Harn studiert. Er hat die reduzierenden Substanzen des normalen Harns in 4 Gruppen eingeteilt: Zucker, Harnsäure, Kreatinin und ein Rest, der von Isomaltose, Dextrin, Glucoronsäure und unbekannten Verbindungen herstammt. — Die drei erstgenannten Substanzen kann man mit speziellen Methoden quantitativ bestimmen, die vierte Gruppe resultiert aus der Differenz zwischen der Totalreduktion und der Reduktion von den drei obengenannten Substanzen. Diese Methode ist noch weit davon entfernt, eine tadellose genannt werden zu dürfen, weil die Substanzen, die fast die Hälfte der Totalreduktion im Urin bedingen, unter dem Namen Rest zusammengefaßt werden; sie bedeutet aber gewiß einen Fortschritt. Lavesson hat für die Bestimmung der einzelnen Werte sehr gute Methoden benutzt. Er hat die Totalreduktion des Harns mit Bangs Methode[2]) bestimmt; diese neue Methode ermöglicht sehr geringe Mengen von reduzierenden Substanzen zu bestimmen

[1]) H. Lavesson, Diese Zeitschr. 4, 40. 1907.

[2]) J. Bang, Diese Zeitschr. 2, 271. 1907.

und mit 10 ccm Flüssigkeit und in ganz kurzer Zeit eine genaue quantitative Bestimmung zu machen.

Der Zucker wird ebenfalls mit Bangs Methode aus der Differenz nach der Vergärung bestimmt. Die Harnsäure ist nach Hopkins-Folin, das Kreatinin nach Folin bestimmt worden. Die Differenz zwischen der Totalreduktion und den drei anderen Zahlen entspricht der unbekannten Restreduktion. Man kann diese Berechnung leicht machen, weil Bang festgestellt hat, daß 7 Teile Kreatinin reduzieren wie 4,8 Teile Traubenzucker, 10 Teile Harnsäure wie 3,27 Teile Zucker. — Lavesson hat seine Versuche bei Frauen, Männern und Kindern (4—13 Jahre alt) gemacht und hat folgende Durchschnittszahlen erhalten:

	Männer	Frauen	Kinder
Totale Reduktion in mg Dextrose . . .	3016	2221	1336
mg Zucker 24 Stunden	546	317	262
mg Harnsäure 24 Stunden	686	502	359
mg Kreatinin 24 Stunden	117	724	332
mg als Rest	1439	1206	717

Ich spreche Herrn Dr. Langstein an dieser Stelle für die freundlichen Ratschläge, die mich veranlaßten, diese Versuche an Säuglingen auszuführen, noch meinen herzlichsten Dank aus.

Es wurden 24 stündige Harnmengen von Säuglingen, welche in verschiedener Weise ernährt wurden und sich in verschiedenem Gesundheitszustand befanden, untersucht. Ich habe in jedem Urin Totalreduktion, Harnsäure und Kreatinin mit der obengenannten Methode untersucht. Die Vergärung des Zuckers wurde anstatt mit gewöhnlicher Hefe mit Levurinose gemacht. Ich habe mit Zuckerlösung geprüft, daß die Vergärung vollkommen war und die Levurinose nicht reduzierte. Die Resultate sind folgende:

Ich habe auch, um die Zahlen mit denen von Lavesson besser vergleichen zu können, die absoluten Werte für 24 Stunden berechnet.

Absolute Werte in mg für 100 ccm des Harns.

Nr.	Name	Alter	Gewicht	Ernährung	Gesundheitszustand	Urin 24 Std.	Totalreduktion pro 100 ccm mg	Glucose mg pro 100	Harnsäure mg pro 100	Kreatinin mg pro 100	Rest (in Glucose) mg pro 100
1	Lakotta . . .	3 Monate	4380	Muttermilch	Gesund	480	74	48	10	6,5	18,07
2	Teichert, O. .	3 Monate	4000	Muttermilch	Gesund	380	28	9	9	8,0	9,40
3	Teichert, W. .	$2^1/_2$ Mon.	4300	Muttermilch	Gesund	400	66	32	13	7,0	21,69
4	Wisniewsky .	2 Monate	4000	Muttermilch	Gesund	350	36	8	10	6,0	20,43
5	Finster . . .	9 Monate	4000	Buttermilch	Atrophie	300	65	33	16	7,5	21,31
6	Dembrowsky .	10 Monate	7200	Buttermilch	Chronische Ernährungsstörung	330	59	20	12	11,5	27,06
7	Gnyatezyk . .	7 Monate	2775	Buttermilch	Chronische Ernährungsstörung	520	32	14	13	10,0	7,50
8	Rosemy . . .	2 Monate	3000	Frauenmilch Buttermilch	Lues congenita	300	29	10	15	7,0	9,00
9	Noack . . .	9 Monate	6500	$^2/_3$ Milch	Encephalitis	320	79	40	16	7,5	28,31
10	Nowaczynsky	$4^1/_2$ Mon.	4000	Frauenmilch Buttermilch	Enterokatarrh	380	82	41	20	6,5	28,60
11	Krause . . .	9 Monate	8300	$^2/_3$ Milch	Ekzem	1000	30	14	9	6,0	8,78
12	Emsel	3 Monate	4800	$^1/_3$ Milch	Gesund	700	52	36	11	6,0	8,09
13	Lingenau . .	$1^1/_2$ Mon.	3500	Muttermilch	Gesund	250	75	45	14	7,0	20,35
14	Ronge . . .	$3^1/_2$ Mon.	2500	Frauenmilch	Lues	230	76	46	13	7,5	21,36
15	Radicke . . .	5 Monate	3900	Buttermilch	Enteritis	350	43	22	11	7,0	12,39

Absolute Werte in Mengen von 24 Stunden:

Nr.	Total-reduktion in Dextrose mg	Glucose mg	Harnsäure mg	Kreatinin mg	Rest in Dextrose mg
1	355,20	230,40	28,00	31,20	86,73
2	106,40	34,20	34,20	30,40	35,72
3	264,00	128,00	52,00	28,00	86,78
4	126,00	28,00	35,00	21,00	71,50
5	195,00	99,00	48,00	22,50	63,93
6	194,70	66,00	39,60	37,95	89,29
7	166,40	72,80	17,60	52,00	39,00
8	87,00	30,00	45,00	21,00	27,00
9	252,00	128,00	51,20	24,00	92,59
10	311,60	152,80	79,80	24,70	108,68
11	300,00	120,00	90,50	60,00	87,80
12	364,00	252,00	77,00	42,00	58,63
13	187,50	112,50	30,00	17,50	50,87
14	174,80	59,80	29,90	17,25	55,12
15	150,50	77,00	38,50	24,50	43,36
	215,40	106,10	47,08	30,33	66,40

Durchschnitt.

Die oberen Zahlen lassen klar erkennen, daß der Urin von Säuglingen eine viel geringere Menge reduzierender Substanzen enthält als der Urin von Männern, Frauen und älteren Kindern. Es bleibt vorläufig offen, welche Momente diese großen Differenzen bedingen.

Über den Kreatiningehalt des Säuglingsharns.

Von

Roberto Funaro.

Aus dem chemischen Laboratiorium der Kgl. Universitäts-Kinderklinik in Berlin [Direktor: Geheimrat Heubner]).

(Eingegangen am 19. Mai 1908.)

Ob im Harn eines Säuglings Kreatinin enthalten ist oder nicht, ist eine von den vielen Fragen des Säuglingsstoffwechsels, die der endgültigen Lösung harren.

Kreatininstoffwechsel des erwachsenen Organismus, der Kreatiningehalt in Nahrungsmitteln, Muskeln, Harn, sind schon von vielen Autoren studiert worden. Diesbezügliche Arbeiten, besonders die von Meißner[1]), Voit[2]), Rubner[3]) und Baldi[4]) haben klar erwiesen, daß die Kreatininausscheidung von der Nahrung stark beeinflußt wird.

Studien von Oddi und Tarnulli[5]), Grocco[6]), Moitessier[7]) und Gregor[8]) haben uns ferner gezeigt, daß verstärkte Muskeltätigkeit den Kreatiningehalt des Urins steigern. Dieselben Autoren haben auch gefunden, daß bei Fieber und kachektischen Prozessen, in denen der Eiweißzerfall erhöht ist, sich der Kreatiningehalt des Harns vermehrt. Die Nahrung der Säuglinge ist, soweit sie aus Milch besteht, kreatinfrei und demnach

[1]) Meißner, Zeitschr. f. rat. Med. **4**, 97, **26**, 225, **31**, 283.
[2]) Voit, Zeitschr. f. Biol. **4**, 112.
[3]) Rubner, Zeitschr. f. Biolog. **84**, 265.
[4]) Baldi, Centralbl. f. klin. Med. **10**, 651.
[5]) Oddi e Carnulli, Boll dell'Acc. med. di Roma **19**, 1893,
[6]) Grocco, Annali di Clinica e di Farmacol **4**, 1886.
[7]) Moitessier, Compt. rend. de la Soc. de Biol. **43**, 573, 1891.
[8]) Gregor, Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**.

nicht als Kreatininquelle zu betrachten. Das Kreatinin im Säuglingsharn in diesem Falle würde demnach seine Herkunft nur dem endogenen Kreatininstoffwechsel verdanken. Hoffmann[1]) und Pouchet[2]) haben im Harn des Säuglings Kreatinin gesucht, aber keins gefunden. Grocco[3]) jedoch hat in vereinzelten Fällen wenige mikroskopische Kreatininchlorzinkkrystalle entdeckt. Rietschel[4]) schließt aus wiederholten Versuchen, daß der Harn des Säuglings kein Kreatinin enthält.

Die Methode, deren sich diese Autoren bedienten, war die Chlorzinkmethode nach Neubauer und Salkowski. Kreatinin wurde in dem Niederschlag entweder mikroskopisch oder mit der Weylschen Reaktion gesucht. Neuerdings hat eine Arbeit von Folin[5]) die Methodik der Bestimmung des Kreatinins auf eine neue Basis gestellt. Folin hat für seine Methode die Jaffésche Reaktion benutzt. Er hat beobachtet, daß 10 ccm einer 0,01 %igen Kreatininlösung mit 15 ccm Pikrinsäure und 500 ccm Wasser dieselbe Färbung geben wie eine halbnormale Kaliumbichromatlösung. Die beiden Farben werden mit Hilfe eines Colorimeters verglichen, woraus sich eine Methode einer quantitativen Bestimmung des Kreatinins ergibt. Von Hoogenhuyze und Verploegh[6]) und von Klercker[7]) haben diese Methode für ihre Versuche benutzt und sie für sehr gut befunden. Amberg und Morrill[8]) haben die Methode für den Harn der Neugeborenen angewandt und gefunden, daß die kleinen Mengen Kreatinin, welche im Harn eines Säuglings enthalten sind, mit der Folinschen Methode ermittelt, keine deutlichen Ausschläge geben; sie empfehlen daher, den Urin zu konzentrieren. Ich habe mich bei meinen Versuchen über Kreatininausscheidung im Säuglingsharn der Folinschen Methode bedient, aber an Stelle des Colorimeters Düboscq einen neuen Apparat von Plesch angewandt, der besonders gut dazu ge-

[1]) Hofmann, Virchows Archiv 48, 1869.

[2]) Pouchet, Journal de Thérap. 7.

[3]) Grocco, Loc. cit.

[4]) Rietschel, Jahrb. f. Kinderheilk. Nr. 7, 61, 4, 615.

[5]) Folin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 223.

[6]) Von Hoogenhuyze u. Verploegh, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 415.

[7]) Von Klercker, Diese Zeitschr. 8, 33.

[8]) Amberg u. Morrill, Journ. of Biol. Chem. 3, 311.

Nr.	Name	Alter	Gewicht	Gesundheitszustand	Ernährung	Urin 24 Std.	Kreatinin pro 10 mg	Kreatinin 24 St. mg	Kreatinin pro kg Gewicht	Bemerkungen
1.	Lakotta . . .	3 Monate	4380	Gesund	Frauenmilch	480	0,65	31,20	7,12	
2.	Teichert, Otto .	3 Monate	4000	Gesund	Frauenmilch	380	0,80	30,40	7,6	
3.	Teichert, Walter	$2^1/_2$ Monate	4300	Gesund	Frauenmilch	400	0,70	28,00	6,51	
4.	Wisniewsky . .	2 Monate	4000	Gesund	Frauenmilch	350	0,60	21,00	5,25	
5.	Finster	9 Monate	4000	Atrophie	Buttermilch	300	0,75	22,50	4,62	
6.	Dembowsky .	10 Monate	7200	Chronische Ernährungsstörung	Buttermilch	330	1,15	37,95	5,27	
7.	Gnyatezyk . .	7 Monate	4775	Chronische Ernährungsstörung	Buttermilch	520	1,00	52,00	10,91	
8.	Rosemy . . .	2 Monate	3000	Lues congenita	Frauenmilch Buttermilch	300	0,70	21,00	7,00	
9.	Noack	9 Monate	6500	Encephalitis	$^2/_3$ Milch	320	0,75	24,00	3,70	
10.	Nowaczynski .	$4^1/_2$ Monate	4000	Enterokatarrh	Frauenmilch Buttermilch	380	0,65	24,70	6,17	
11.	Krause	9 Monate	8300	Ekzem	$^2/_3$ Milch	1000	0,60	60,00	7,23	
12.	Emsel	3 Monate	4800	Gesund	$^1/_3$ Milch	700	0,60	42,00	8,75	
13.	Lingenau . . .	$1^1/_2$ Monate	3500	Gesund	Frauenmilch	250	0,70	17,50	5,00	
14.	Ronge	$3^1/_2$ Monate	2500	Lues	Frauenmilch	230	0,75	17,25	6,90	
15.	Radicke . . .	5 Monate	3900	Enteritis	Buttermilch	350	0,70	24,50	6,28	

eignet ist und die colorimetrischen Bestimmungen viel leichter und sicherer macht.[1])

Zuerst habe ich mit einer titrierten Kreatininlösung die Folinsche Methode geprüft und folgende Resultate bekommen:

Verdünnung	Kreatininmenge	Bestimmungen nach Folin
10 ccm	1 mg	0,4 mg
10 „	2 „	1,0 „
10 „	3 „	1,55 „
10 „	4 „	2,55 „
10 „	5 „	3,15 „
10 „	6 „	5,70 „
10 „	7 „	6,60 „
10 „	8 „	7,80 „
10 „	9 „	6,65 „
10 „	10 „	9,75 „
100 „	10 „	8,10 „

Diese Zahlenreihe beweist, daß, um ein zuverlässiges Resultat zu erhalten, es bei 10 ccm Flüssigkeit nötig ist, 6 mg Kreatinin zu haben. Eine geringere Kreatininmenge oder eine größere Verdünnung machen die Resultate unsicher. Ziemlich gute, aber nicht absolut einwandfreie Resultate habe ich auch mit mehr verdünnten Lösungen erhalten, wenn die Wasserverdünnung auf 250 anstatt auf 500 gebracht wurde. In meinen Versuchen habe ich eine möglichst große Menge Urin konzentriert, auf 10 ccm aufgefüllt und diese mit der Folinschen Methode untersucht. Die Resultate waren folgende:

Um zu konstatieren, ob an verschiedenen Tagen und bei verschiedenartiger Ernährung beim gleichen Individuum sich Differenzen in der Ausscheidung des Kreatinins ergeben, habe ich den Urin desselben Säuglings wiederholt untersucht und folgende Resultate erhalten:

Aus dieser Tabelle kann man schließen: 1. daß im Säuglingsharn immer Kreatinin enthalten ist. 2. Daß die individuellen Verschiedenheiten unter pathologischen und normalen Verhältnissen nicht sehr groß sind, auch

[1]) Meinen besonderen Dank spreche ich Herrn Dr. Plesch für die liebenswürdige Überlassung des Apparates aus.

Name	Ernährung	Kreatinin 24 Std.
Krause I	$^2/_3$ Milch	60,00
Krause II	$^2/_3$ Milch	55,00
Krause III	$^1/_3$ Milch	77,00
Krause IIIa	$^1/_3$ Milch mit Beikost von Casein und Fett	67,20
Krause IV	$^1/_3$ Milch	60,00
Finster XVIII	Buttermilch	75,00
Finster XIX	$^2/_3$ Milch	65,00
Finster XXI	Buttermilch	63,00
Emsel 8/9	$^1/_3$ Milch	42,00
Emsel 11/12	$^1/_3$ Milchzucker	40,00
Emsel 16/17	$^1/_3$ Milch mit Zulage von Caseinbutter	36,00
Emsel 20/21	Casein und Fett	38,00

wenn die Ernährung des Individuums verschiedenartig ist. 3. Daß die Menge des bei Säuglingen zur Ausscheidung gelangenden Kreatinins viel geringer ist bei Erwachsenen, in dem pro 10 ccm Harn 6 bis 12 mg Kreatinin enthalten sind. Der geringe Kreatiningehalt erklärt, warum die Autoren, welche das Kreatinin mit der Chlorzinkmethode gesucht haben, nur negative Resultate verzeichneten. Herrn Privatdoz. Dr. Langstein sage ich für seine freundliche Hilfe und Ratschläge noch meinen besonderen Dank.

Studien in der Chlorophyllgruppe. II

Von

L. Marchlewski.

Über die Umwandlung des Phyllotaonins in Phytorhodine.

Von

Tad. Koźniewski und L. Marchlewski.

Aus dem med. chem. Institut der Universität Krakau.

(Vorgelegt der Akademie der Wissenschaften zu Krakau.)

(Eingegangen am 21. Mai 1908.)

Bekanntlich sind die Umwandlungsprodukte des Chlorophylls unter dem Einfluß von Säuren total verschieden von denen des Alkachlorophylls. Während letzteres Chlorophlyllan, Phyllocyanin und Phylloxanthin liefert,[1]) gibt letzteres unter analogen Bedingungen Phyllotaonin bzw. seine Ester. Diese Ester werden gebildet, wenn bei gewöhnlicher Temperatur Salzsäure auf die alkoholische Lösung des Alkachlorophylls einwirkt. Das Verseifungsprodukt der Ester war unlängst Gegenstand ausführlicher Studien unsererseits. Wir zeigten, daß Phyllotaonin in eine neue Substanz beim Erwärmen, mit oder ohne Lösungsmittel, umgewandelt wird, welche wir mit dem Namen Allophyllotaonin bezeichneten.[2])

Allophyllotaonin unterscheidet sich in vielen Beziehungen von seiner Muttersubstanz, dem Phyllotaonin. Die Absorptionsspektra beider Substanzen sind ganz verschieden. Allophyllotaonin ist eine viel schwächere Base als Phyllotaonin; während

[1]) Diese Zeitsch. 10, 131, 1908.

[2]) Bull. de l'Acad. des sciences de Cracovie 1907, 616.

letzteres seiner ätherischen Lösung bereits durch 6% Säure entzogen wird, geht Allophyllotaonin nicht in 15%ige Säure über.

Allophyllotaonin wird leicht in Phyllotaonin durch Alkawirkung übergeführt; die Umwandlung vollzieht sich langsam bei gewöhnlicher Temperatur, schnell beim Erwärmen. Es scheint wahrscheinlich, daß die Umwandlung der Phyllotaonine ineinander auf der Öffnung, bzw. Schließung einer Lactamgruppierung beruht.

Die Umwandlungen des Alkachlorophylls unter dem Einfluß von Säuren hei höheren Temperaturen ist von ganz anderer Art, wie Willstätter[1]) gezeigt hat. In diesem Falle werden Substanzen erhalten, die mit dem Namen Phytorhodine belegt werden. Dieselben besitzen eine rote Farbe, während das Phyllotaonin in neutralen Lösungsmitteln sich mit olivgrüner Farbe und Allophyllotaonin mit rötlich-grauer Farbe löst.

Die Tatsache, daß die Umwandlung des Alkachlorophylls verschieden verläuft, je nach den waltenden äußeren Bedingungen, macht die Annahme wahrscheinlich, daß die Bildung der Phytorhodine in zwei verschiedenen Phasen verläuft. Die Wirkung der Säuren auf Alkachlorophyll bei gewöhnlicher Temperatur muß zunächst die Bildung von Phyllotaonin verursachen, welches bei der späteren Temperaturerhöhung in Allophyllotaonin übergeht, welches endlich weiter der Umwandlung in Phytorhodine unterliegt. Diese Ansicht wird auch durch die unten zu beschreibenden Versuche vollauf bestätigt.

Das zu den vorliegenden Studien nötige Allophyllotaonin haben wir nach einer neuen Methode dargestellt, welche sich auf eine frühere von dem einen von uns mit C. A. Schunck[2]) gemachte Beobachtung stützt. Es wurde damals bemerkt, daß der Baryumniederschlag, welcher nach dem Verfahren von Hartley[3]) erhalten wird, bei der Behandlung mit Salzsäure eine Substanz liefert, deren Absorbtionsspektrum aus 6 Bändern bestand, welches früher als charakteristisch für Phyllotaonin angesehen wurde. Nach unseren neuesten Untersuchungen[4])

[1]) Liebigs Ann. 350, 1.
[2]) Journ. Chem. Soc. 1900, 1080.
[3]) Journ. Chem. Soc. 1891, 106.
[4]) L. c.

wird dieses Spektrum durch ein Gemisch von Phyllotaonin und Allophyllotaonin verursacht. Wird anstatt der Bariumverbindung das in der Kälte dargestellte Kaliumsalz des Alkachlorophylls der Einwirkung von konzentrierter Salzsäure unterworfen, so verläuft die Zersetzung in analoger Weise, nur ist das Allophyllotaonin das Hauptprodukt der Reaktion. Alkachlorophyll, welches in der Wärme dargestellt wurde, verhält sich ähnlich, aber die Reaktion ist mehr kompliziert; neben dem Allophyllotaonin wird eine ziemlich große Menge schwer löslicher Nebenprodukte gebildet.

Die Darstellung des benutzten Kaliumsalzes des Alkachlorophylls geschah wie folgt: Der Doppelextrakt von Brennesselblättern, welche aus getrocknetem Material mit 96% Alkohol hergestellt war, wurde mit so viel KOH versetzt, daß eine 2%ige Lösung entstand. Nach einiger Zeit schied sich am Boden des Gefäßes eine braune Substanz ab, welche löslich in Wasser war und bereits häufig in den Chlorophyllliteratur besprochen wurde. Die grüne Lösung wurde von diesem Bodenabsatz abgegossen und für kurze Zeit mit einem Strome von Kohlensäure behandelt. Darauf schied sich eine beträchtliche Menge des Kaliumsalzes des Alkachlorophylls in Form eines grünen Pulvers ab. Letzteres wurde abfiltriert und das Filtrat mit Calcium- oder Bariumchloridlösung behandelt, wodurch der Rest des grünen Farbstoffes abgeschieden wurde.

30 g des Kaliumsalzes, welches durch eine geringe Menge Kaliumcarbonats verunreinigt war, wurden allmählich in 350 ccm konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,19 g) eingetragen. Die erhaltene dunkelgrüne Lösung wurde bei gewöhnlicher Temperatur während zweier Tage sich selbst überlassen und sodann in das vielfache Volum von Wasser eingegossen. Das Ganze wurde sodann mit Natriumcarbonat neutralisiert, wobei darauf acht gegeben wurde, daß die Temperatur 25° nicht überstieg. Der gebildete Niederschlag wurde sodann abfiltriert und bei 100° getrocknet. Das erhaltene Produkt löste sich leicht in Chloroform, schwieriger in Äther; die Lösungen zeigten das charakteristische Allophyllotaoninspektrum. Um dasselbe in Phyllotaonin umzuwandeln, lösten wir es in siedender $^1/_2$%iger NaOH-Lösung, kühlten die Lösung ab, säuerten mit Salzsäure an und extrahierten den Farbstoff mit Äther. Die filtrierte ätherische

Lösung wurde sodann mit 6% Salzsäure extrahiert, wobei Phyllotaonin in Lösung ging, während braune Verunreinigungen im Äther znrückblieben. Die saure Lösung wurde nun mit Natriumcarbonat neutralisiert, der Farbstroff durch Äther extrahiert und die ätherische Lösung eingedampft. Der Rückstand repräsentierte Allophyllotaonin, welches aus dem Phyllotaonin bei erhöhter Temperatur entstand.

Allophyllotaonin kann aus Alkohol in feinen Nadeln krystallisiert werden. Wir haben jetzt eine größere Menge dieses Produktes vorrätig und hoffen, demnächst über dessen Zusammensetzung ausführlich zu berichten.

Die Umwandlung des Allophyllotaonins in Substanzen, welche wir für identisch mit den Phytorhodinen von Willstätter halten, erfolgt unter folgenden Bedingungen:

Ein Teil Allophyllotaonin und ca. 50 T. 20%ige alkoholischer Salzsäure werden während 6 Stunden auf dem Wasserbade unter Rückfluß erwärmt. Die ursprünglich grüne Lösung nimmt allmählich eine olivgrüne Farbe an, und sobald diese Reaktionsphase erreicht ist, geht die weitere, d. h. die Umwandlung in braunrote Farbstoffe, rasch vonstatten.

Das Reaktionsprodukt wird nun in ein größeres Wasserquantum eingetragen, die Säure durch Natriumhydratzusatz abgestumpft, wobei durch Kühlung die Temperatur unterhalb 20° gehalten wurde. Nun werden die Farbstoffe mit Äther extrahiert und in Alkali lösliche und in diesem unlösliche getrennt. Zu dem Ende wurde die ätherische Lösung mit ganz schwacher Natronlauge extrahiert, die alkalische Lösung angesäuert und mit Äther die freien Farbstoffe extrahiert. Diese Lösung wurde nun der Fraktionierung mit Salzsäure verschiedener Konzentration unterworfen. Angewandt wurden $2^1/_2$%, 5%, $7^1/_2$% und 10% Salzsäure. Die beiden schwächeren Säuren extrahierten in der Regel nur kleine Farbstoffmengen, die beiden stärkeren größere Mengen. Bei einigen Versuchen traten die Farbstoffe mit geringerer Basizität in ungefähr der gleichen Menge auf wie diejenigen mit größerer Basizität. Der zurückbleibende erschöpfte Äther enthält nach diesen Behandlungen nur Spuren bräunlicher Farbstoffe.

In ähnlicher Art wurden die keine sauren Eigenschaften besitzenden Farbstoffe verarbeitet. Sie wurden ebenfalls in

4 verschiedene Fraktionen zerlegt, durch Extraktion der ursprünglichen ätherischen Lösung mit 2, 5, 7 und 10% Salzsäure. Auch in diesem Falle nahmen die beiden schwächeren Säuren weniger Farbstoff auf als die stärkeren. Aus den sauren Lösungen wurden die Farbstoffe nach dem Verdünnen mit Wasser mit Äther extrahiert. Die beiden schwach basischen Fraktionen krystallisieren äußerst leicht aus Äther in schönen pfirsichroten Nadeln. Der allgemeine Charakter dieser Substanzen stimmt mit dem der Phytorhodine in allen Stücken. Besonders überzeugend für die angenommene Identität beider Farbstoffreihen konnte das spektroskopische Verhalten derselben sein. Da die Phycorhodine in dieser Beziehung noch nicht untersucht waren, haben wir für Vergleichszwecke diese Substanzen nach der Willstätterschen Methode dargestellt.

Die rotbraunen Farbstoffe, welche aus dem Calciumchloridniederschlag[1]) gewonnen waren, wurden zunächst in zwei Reihen geteilt, solche mit sauren und solche mit basischen Eigenschaften, und zwar durch Behandlung der ätherischen Lösung des Gemisches mit verdünnter Natronlauge.

Die ätherische Lösung der sauren Farbstoffe wurde sukzesive mit $2^1/_2$%, 5%, $7^1/_2$%, 10% und 12% Salzsäure behandelt. Die beiden schwächeren Säuren lösten in diesem Falle ziemlich bedeutende Mengen von Farbstoffen auf, während die stärkeren weniger gefärbt wurden. Die Farbe der sauren Lösungen war grün mit blauem Stich. Nach dem Verdünnen der sauren Lösungen mit Wasser wurden die einzelnen Farbstoffe in Äther aufgenommen. Die Farbe sämtlicher Lösungen war kirschrot.

Die Absorptionsspektren der Farbstoffe von der Basizität $7^1/_2$%, 10% und 12% in ätherischer Lösung waren in jeder Beziehung identisch. Nach ihrer Intensität konnten die Bänder wie folgt geordnet werden:

$$IV > V > I > III > II$$

Das dritte Band ist komplex und erinnert etwas an ein entsprechendes Phyllporphyrinband. Der mehr gebrochene Teil desselben ist nahezu ebenso dunkel wie Band I. Sehr konzentrierte Lösungen zeigen noch ein sechstes Band im Gelb, welches als IIa bezeichnet werden mag.

---

[1]) Liebigs Ann. 350, 1.

Die Lage der Bänder, welche durch die aus 7- oder 10%iger Salzsäure isolierten Farbstoffen hervorgerufen werden, charakterisieren sich durch die folgenden Wellenlängen:

A.	B.	C.
Konzentration 1	Konzentration 1:3	Konzentration 1:6
I λ 671—641	λ 669—655,5	max. 661
II λ 637—629	λ max. 635	—
III λ 590—570,5	Schatten von 585 an λ 581—574	max. 577
IV λ 554—532	λ 551—574	„ 545
V λ 517—486	λ 516—496	„ 504

Der von 2,5% Säure aufgenommene Farbstoff zeigt das erste Band nur schwach, und Band V ist dunkler als Band IV. Die Bänder müssen daher in bezug auf ihre Intensität in folgender Reihenfolge geordnet werden:

$$V > IV > III > I = II.$$

Die Lage der Bänder, welche durch diesen Farbstoff erzeugt werden, entspricht in einer Konzentration von ungefähr derselben Stärke wie obige Konzentration A den folgenden Wellenlängen:

Band I λ 663—653
„ II λ 637—626
„ III λ 594—571
„ IV λ 556—532
„ V λ 518—483,5.

Der aus der 5% Säurefraktion isolierte Farbstoff zeigte ein analoges Spektrum. Ein Unterschied war nur in der relativen Intensität der zwei ersten Bänder zu bemerken. Band I erschien hier stärker als Band II.

Die Phytorhodinäther, welche nach der Entfernung durch Alkali der mit sauren Funktionen behafteten Farbstoffe im Äther zurückbleiben, werden ebenfalls durch Behandlung mit $2^1/_2$, 5, $10^1/_2$, 10 und 12% Salzsäure in verschiedene Fraktionen zerlegt. Die beiden schwächeren Säuren nahmen nur geringe Farbstoffmengen auf, die stärkeren größere. Aus den sauren Lösungen wurden die Farbstoffe auf gewöhnliche Art durch Verdünnen mit Wasser und Ausschütteln mit Äther in freiem Zustande gewonnen.

In spektraler Hinsicht unterscheiden sich die Äther der Phytorhodine nur wenig von den sauren Farbstoffen. In den stärker basischen Farbstoffen ist das erste Band weniger akzentuiert als in den weniger basischen Farbstoffen. Die Lage der Bänder des aus der $7^1/_2{}^0/_0$igen Fraktion gewonnenen Farbstoffes entspricht den Wellenlängen:

Band I λ 671 —653
„ II λ 638 —630
„ III λ 594 —570,5
„ IV λ 555,5—532
„ V λ 520 —486

Nach der relativen Intensität können dieselben wie folgt geordnet werden:

IV > V > III > I > II.

Die ätherische Lösung des durch $10^0/_0$ Salzsäure aufgenommenen Farbstoffs zeigt ganz analoge Absorptionsverhältnisse. Messungen ergaben:

	A. Konzentration 1	B. Konzentration 1:3	C. Konzentration 1:6
Band I	λ 671—653	max. λ 660	
„ II	λ 637,5—631	„ λ 633	
„ III	λ 590—570	Schatten von λ 585 an	
		λ 578—573	max. λ 576
„ IV	λ 554—533	λ 550,5—539	„ λ 545
„ V	λ 518—487,5	λ 512,0—493	„ λ 506

Band III in Konzentration B ist ein sogenanntes Doppelband. Es ist aber schwer, die Lage des stärker gebrochenen Randes des schwächeren Bandes zu messen, wir geben daher nur die Lage des weniger gebrochenen Randes an.

In der ätherischen Lösung, welche aus der $12\,^0/_0$igen sauren Fraktion erhalten wurde, erscheint Band I noch stärker als in der vorhergehenden Lösung, und müssen daher die Bänder nach ihrer relativen Intensität in folgender Reihenfolge geordnet werden: IV > V > I > III > II.

Eine konzentrierte Lösung zeigte die Bänder in folgender Lage:

Band I λ 677—652
„ II λ 638—632
„ III λ 592,5—572
„ IV λ 554—533
„ V λ 518—485,5

Die rückständige ätherische Lösung, aus welcher die erwähnten Farbstoffe durch Salzsäuren verschiedener Konzentrationen entfernt wurden, zeigt eine braune Farbe; auch sein Absorptionsspektrum ist hauptsächlich durch ein starkes Band im Rot charakterisiert, dessen Lage derjenigen des ersten Bandes entspricht, welches von allen oben besprochenen Lösungen gezeigt wird. Eine direkte Messung der Lage des genannten Bandes entspricht den Wellenlängen λ 682 — λ 650. Ausser diesem Bande zeigt die Lösung noch drei Bänder, die aber überaus schwach sind. Die Anwesenheit dieses starken Bandes in der rückständigen ätherischen Lösung und der Umstand, daß ein analoges Band von sämtlichen untersuchten Farbstoffmengen im Spektrum verursacht wird, welches jedoch je nach der Basizität der untersuchten Farbstoffe stark variiert, wobei die mit der geringsten Basizität ausgestatteten Farbstoffe dieses Band am stärksten zeigen, machte es wahrscheinlich, daß dieses Band im Rot den Phytorhodinen überhaupt nicht eigen ist, sondern von Verunreinigungen stammt. Diese Ansicht wurde durch die Tatsache, daß, obwohl die ätherische, rohe Lösung des Farbstoffs, welcher der 12 %igen sauren Fraktion entstammt, das Band im Rot sehr stark zeigt, Krystalle, welche aus der Lösung mit der Zeit beim Stehen abgeschieden werden, in ätherischer Lösung kein solches Band verursachen. Die erwähnten Krystalle lösen sich nur schwer in Äther, aber längeres Erhitzen mit dem Lösungsmittel unter Rückfluß verursacht doch die Entstehung genügend konzentrierter Lösungen, an welchen Wellenlängenmessungen ausgeführt werden können. Die alkoholischen sauren Lösungen der obigen Farbstoffe zeigen ganz andere Spektren als die neutralen. Die Farbe der Lösungen ist rötlich violett, und das Absorptionsspektrum besteht aus drei Bändern. Eins von diesen liegt im Rot, das zweite im Orange und das dritte, sehr breite Band zwischen der Na- und Tl-Linie. Die beiden letztgenannten Bänder erscheinen in allen untersuchten Lösungen, während das erste mehr oder weniger dunkel erscheint, je nachdem ein weniger oder stärker basischer Farbstoff untersucht wird. Der aus der $2^1/_2$ HCl-Fraktion stammende Farbstoff zeigt übrigens das genannte Band überhaupt nicht, während der aus der $7^1/_2$ %igen HCl-Fraktion stammende dieses Band zwar schon zeigt, aber weniger ausgeprägt als das zweite

Band. Die aus der 10%igen HCl-Fraktion stammende Substanz zeigt das erste Band noch deutlicher, es ist sogar breiter als Band II, aber weniger intensiv. Endlich erscheint das Band im Rot im Spektrum des Farbstoffes, welcher aus der 12%igen HCl-Fraktion isoliert wurde (ätherische Rohlösung), äußerst deutlich; es ist dunkler und breiter als Band II. Die Lage der Bänder entspricht den folgenden Wellenlängen:

In NaOH lösliche Farbstoffe.
Farbstoff von der Basizität: 2,5% HCl.
Lösungsmittel: 1% HCl in Alkohol.

A. Konzentration 1.	B. Konzentration 1:3.	C. Konzentration 1:6.
Band I λ 618—604	I λ 617—605	max. 611,5
„ II λ 589—551	IIa λ 587—574	„ 581,0
	IIb λ 569—555	„ 563,0

Farbstoffe von der Basizität 7 und 10% HCl.
Lösungsmittel wie oben.

A. Konzentration 1.	B. Konzentration 1:3.	C. Konzentration 1:6.
Band I λ 650—633	I λ 649—637	max. λ 644
„ II λ 618—605	II λ 617—606	„ λ 610
„ III λ 591—550	IIIa λ 588—576	„ λ 580
	IIIb λ 571—555	„ λ 560

In NaOH unlösliche Farbstoffe.
Lösungsmittel wie oben.

Basizität 7% HCl.	Basizität 10% HCl.	Basizität 12% HCl.
Band I λ 645—631	λ 649—633	λ 650—632
„ II λ 617—602	λ 618—603	λ 616—602
„ III λ 587—550	λ 590—552	γ 587—548
III > II > I	III < II < I	III < I = II

Der in 2,5% HCl lösliche Farbstoff dieser Serie zeigt das erste Band, wie bereits hervorgehoben, überhaupt nicht. Bei weiterer Verdünnung zeigt Band III eine Spaltung analog wie in den freien Farbstoffen dieser Serie. Außerdem zeigen sämtliche Lösungen ein Band im blaugrünen Teil des Spektrums; dasselbe ist nur matt. Seine Lage wurde für die krystallisierten Präparate bestimmt, siehe unten.

Die Absorptionsspektren der Farbstoffe, welche nach Willstätters Methode aus dem Kaliumsalz des Alkachloro-

phylls erhalten werden, sind denen, welche die aus Calciumniederschlage erhaltenen charakterisieren, ganz analog, wie aus folgenden Messungen ersichtlich.

Ätherische Lösung des in NaOH und $2^1/_2$% HCl löslichen Farbstoffs.

	A. Konzentration 1	B. Konzentration 1:2	C. Konzentration 1:3
Band I	λ 667—650	λ 667—655	
„ II	λ 637—627	max λ 632	
„ III	λ 593—573	λ 588—572	λ 585—572
„ IV	λ 553—533	λ 551—537	λ 549—538
„ V	λ 519—491	λ 516—493	λ 513,5—496,5

Die letzterwähnte Konzentration zeigt die beiden ersten Bänder nur schwach.

Nach der relativen Intensität können die Bänder in folgender Reihe geordnet werden:

$$V > IV > III > II = I$$

In dieser Beziehung unterscheidet sich der aus der $2^1/_2$%igen HCl-Fraktion isolierte Farbstoff sehr deutlich von den schwächer basischen Farbstoffen. Die letzteren geben Absorptionsspektra, deren Band IV das dunkelste von allen ist. Ganz ähnliche Verhältnisse wurden bei den Farbstoffen bemerkt, welche aus dem Calciumchloridniederschlag erhalten wurden.

Ätherische Lösung des in NaOH und 5% HCl löslichen Farbstoffes.

	A. Konzentration 1	B. Konzentration 1:3	C. Konzentration 1:6
Band I	λ 671—658	max. λ 659	
„ II	λ 642—631	„ λ 636	
„ III	λ 594—574	Schatten von λ 585 an λ 580—572	max. λ 579
„ IV	λ 557—538	λ 552—550	„ λ 544,5
„ V	λ 520—489	λ 514—495	„ λ 507

Band III zeigt in Konzentration B eine Spaltung. Die Messung des mehr gebrochenen Randes des ersten Bandes ist jedoch unsicher. Der Farbstoff mit der Basizität 12% HCl veranlaßt ganz analoge Absorptionen, nur ist das erste Band noch dunkler und breiter. Die ätherische Lösung setzt nach einiger Zeit Krystalle ab, deren Lösungen das Band im Rot nicht mehr zeigen.

Ätherische Lösung von Krystallen, welchen die Basizität 12% HCl entspricht.

	A. Konzentration 1	B. Konzentration 1:3	C. Konzentration 1:6
Band I	λ 644—633	max. λ 638	
„ II	λ 595—572	Schatten von λ 586 an λ 582—575	max. λ 576
„ III	λ 558—532	λ 554—541	„ λ 549
„ IV	λ 519—489	λ 517—499	„ λ 512

Band II in Konzentration B ist in zwei schmälere gespalten. Das erste von diesen erscheint wie ein „Schatten", dessen mehr gebrochener Rand nicht mit genügender Sicherheit gemessen werden kann. Nach der Intensität können die Bänder in folgender Art geordnet werden:

$$III > IV > II > I$$

Band I ist äußerst schwach.

In salzsäurehaltigem Alkohol lösen sich die Krystalle sehr leicht mit rotvioletter Farbe. Konzentrierte Lösungen verursachen 3 Absorptionsbänder, von denen das im Grün gelegene sehr matt erscheint.

Band I λ 623—605
„ II λ 592—546
„ III λ 523—515

Intensitätsskala: $II > I > III$.

Bei weiterer Verdünnung wird Band II gespalten:

Band I λ 617—606,5
„ IIa λ 590—580,0
„ IIb λ 571—557,0

Das ursprüngliche dritte Band ist kaum sichtbar.

Ein abweichendes Spektrum zeigen die Krystalle, wenn sie in 12% wässeriger Salzsäure gelöst werden.

Diese Lösungen verursachen im Spektrum nur 2 Bänder:

Band I λ 617,5—606
„ II λ 573—546

Bei weiterer Verdünnung:

Band I λ 615—607,5
„ II λ 566—559.

Bezüglich der im Ultraviolett verursachten Absorptionen verhalten sich sämtliche beschriebene Farbstoffe ganz analog. Die ätherischen Lösungen verursachen ein starkes Band auf der Linie Hg = 405 $\mu\mu$. Ein bedeutend schlechter definiertes Absorptionsband befindet sich in Region von etwa 380 $\mu\mu$. Außerdem ist auch eine Endabsorption zu bemerken.

Nach dieser Beschreibung der Absorptionsverhältnisse der von Mieg und Willstätter erhaltenen Phytorhodine können wir jetzt zur Besprechung der Umwandlungsprodukte des Phyllotaonins, bzw. Allophyllotaonins übergehen.

Zunächst ist zu erwähnen, daß die Umwandlung des Allophyllotaonins in rote Farbstoffe viel glatter erfolgt, als die der Salze des Alkachlorophylls. Dies folgt aus der Tatsache, daß die verschiedenen Farbstofffraktionen in der Regel kein Band im Rot zeigen, welches von den roten ätherischen Lösungen der Phytorhodine im Spektrum erzeugt wird, und welches, wie oben gezeigt wurde, durch Verunreinigungen verursacht wird. Ein solches Band wurde nur von der rohen ätherischen Lösung des in Alkali unlöslichen Farbstoffes mit der Basizität 12% HCl im Spektrum erzeugt. Die mit Hilfe der schwächeren Säuren erzeugten Fraktionen zeigen das Band im Rot nicht. Die Krystallisationsfähigkeit ist in diesem Falle ebenfalls größer. Die schwächer basischen Farbstoffe (durch 10 oder 12% HCl gelösten) krystallisieren gleich leicht, ob nach dem alten Verfahren oder nach dem neuen erzeugt, während aber die nach dem alten Verfahren erhaltenen, von 5 oder 7% Säure aufgenommenen Farbstoffe eine Reihe von Reinigungen durchlaufen müssen, ehe sie zum Krystallisieren gebracht werden können, krystallisieren die nach dem neuen Verfahren erhaltenen Substanzen von gleicher Basizität mit Leichtigkeit.

Um die Identität der Absorptionsspektren der Umwandlungsprodukte des Phyllotaonins mit den Phytorhodinen zu beweisen, mögen die folgenden Messungen angeführt werden.

Rohe ätherische Lösung des durch 12% HCl aufgenommenen in NaOH unlöslichen Farbstoffes.

A. Konzentration 1	B. Konzentration 1:3	B. Konzentration 1:6
Band I λ 663—648	max. λ 654	
„ II λ 638—629	„ λ 634	

A. Konzentration 1	B. Konzentration 1:3	C. Konzentration 1:6
„ III λ 594—569	Schatten von λ 585 an λ 580—571,5	max. λ 575
„ IV λ 555—532	λ 551—538	„ λ 544,5
„ V λ 519—486	λ 514—497	„ λ 508

Nach ihrer relativen Intensität reihen sich die Bänder wie folgt an.

$$IV > V > III > II > I.$$

Band III erscheint in Konzentration B gespalten.

Rohe ätherische Lösung des durch 10% NHCl aufgenommenen in NaOH unlöslichen Farbstoffes.

A. Konzentration 1	B. Konzentration 1:3	B. Konzentration 1:6
Band I λ 644—632	max. λ 635	
„ II λ 593—571	Schatten von λ 584,5 an λ 582—572	max. λ 576
„ III λ 555—533	λ 550,5—540	„ λ 544,5
„ IV λ 519—484	λ 517—497	„ λ 506

Endlich mögen Messungen von Chloroformlösungen der krystallisierten Farbstoffe, welche nach den beiden verglichenen Methoden erhalten wurden und welche ihren ätherischen Lösungen durch 12% Salzsäure entzogen wurden, gegeben werden.

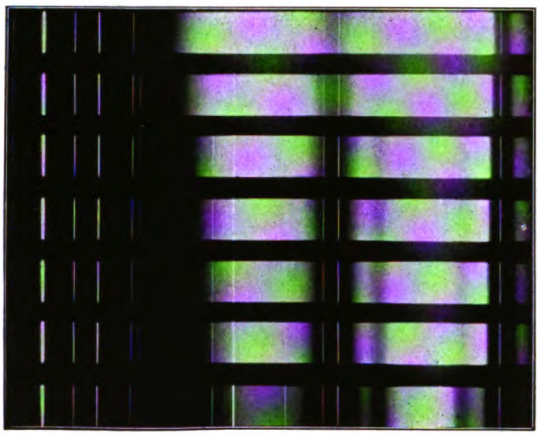
Umwandlungsprodukt des Allophyllotaonins	Phytorhodin
Band I λ 646—639,5	λ 647—641
„ II λ 594—574	λ 594—575
„ III λ 565—547	λ 564,5—549,5
„ IV λ 524—506	λ 525—507

Bei weiterer Verdünnung teilt sich auch hier Band II in zwei neue Bänder.

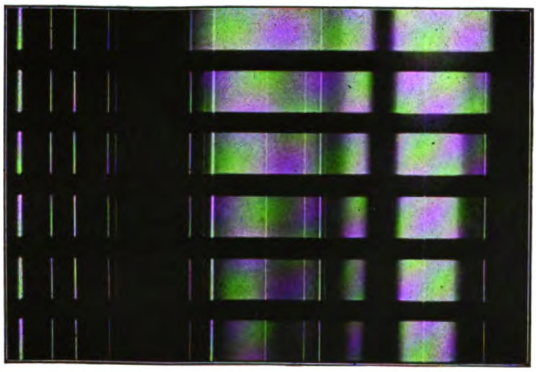
Die Absorptionsverhältnisse im stärker gebrochenen Spektrumteil der Umwandlungsprodukte des Allophyllotaonins sind denen der Phytorhodine ganz analog. Sie brauchen hier nicht noch einmal beschrieben zu werden, die dieser Mitteilung beigefügten Reproduktionen der Spektrogramme erläutern die Verhältnisse genügend.

Um einen Vergleich dieser roten Farbstoffe mit dem Phyllotaonin und Allophyllotaonin anschaulich zu machen, fügen wir auch Photographien des weniger gebrochenen Spektrumteiles bei.

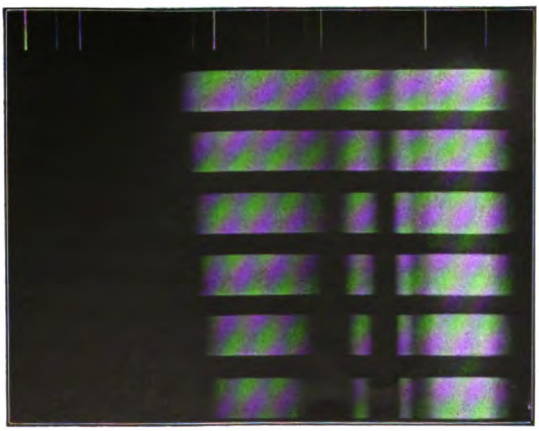
Tafel I.



a



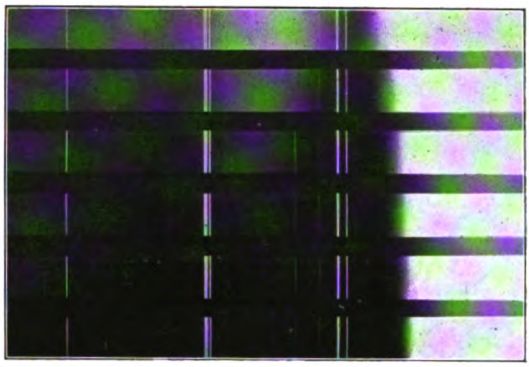
b



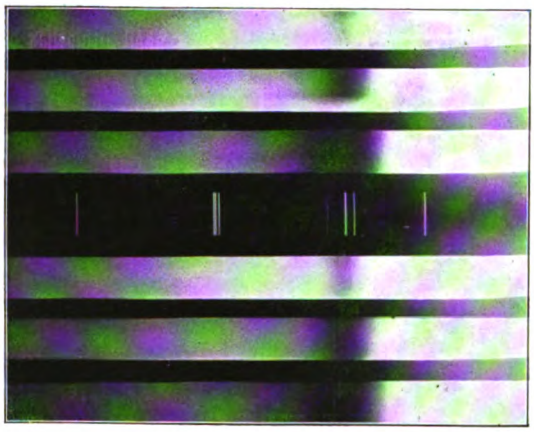
c

a Phyllotaonin in Äther. b Allophyllotaonin in Chloroform.
c Phytorhodin in Chloroform.

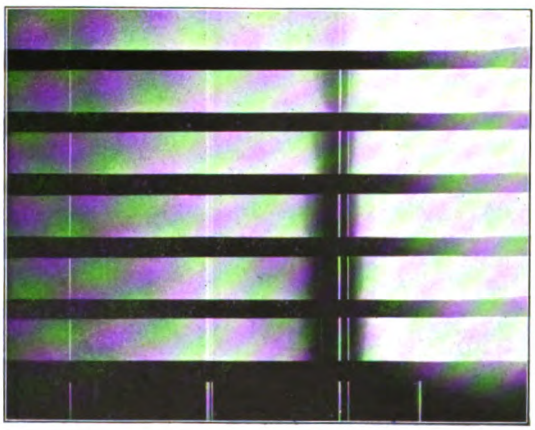
Tafel II.



a



b



c

a Allophyllotaonin in Chloroform. b Phytorhodin in Äther.
c Umwandlungsprodukt des Allophyllotaonins in Äther.

Die benutzten orthochromatischen Platten ermöglichen es leider nicht, auch das erste Allophyllotaoninband im Rot sichtbar zu machen. Um auch die Teilung des zweiten Phytorhodinbandes sichtbar zu machen, haben wir die Photographie einer ziemlich verdünnten Lösung gewählt, auf welcher jedoch das Band I kaum mehr sichtbar ist.

Endlich wurde zum Vergleich auch noch die Photographie des Absorptionsspektrums des Allophyllotaonins im Ultraviolett (in Chloroform gelöst) beigefügt. Dasselbe besteht in der Region zwischen 436 $\mu\mu$ und 334 $\mu\mu$ aus 3 Bändern. Eines derselben ist sehr stark und liegt ungeführt auf der Hg- = 405 $\mu\mu$-Linie, das zweite hinter dem Triplet Hg = 366 $\mu\mu$ und das dritte von der Linie Hg = 334 $\mu\mu$.

In ätherischen Lösungen sind die Bänder etwas mehr nach dem weniger gebrochenen Teil verschoben.

Die oben beschriebenen Resultate beweisen, wie wir glauben unstreitig, daß Allophyllotaonin unter dem Einfluß von Säuren bei Anwesenheit von Alkohol bei höherer Temperatur in Farbstoffe umgewandelt wird, welche mit den Phytorhodinen von Willstätter und Mieg identisch sind.[1]) Daraus folgt also, daß die Umwandlung des Alkachlorophylls in die Phytorhodine in zwei Phasen verläuft, wobei die erste die Bildung des nunmehr gut charakterisierten Phyllotaonins bzw. Allophyllotaonins ist.

Ein sehr auffallender Unterschied zwischen Phyllotaonin und Phytorhodin besteht in dem Verhalten beider Substanzen zu Alkalien bei hohen Temperaturen. Während Phyllotaonin das beste Ausgangsmaterial für die Darstellung des Phylloporphyrins bildet, werden die Phytorhodine durch Behandlung mit alkoholischem Kali bei 200° in jene prächtige Substanz nicht umgewandelt.

Eine unserer nächsten Mitteilungen über Chlorophyllfarbstoffe soll die Zusammensetzung des Allophyllotaonins und der aus ihm entstehenden Phytorhodine behandeln.

[1]) Erwähnt sei, daß Phytorhodin f wahrscheinlich mit unserem Phylloxanthrubin identisch ist.

Ergebnisse neuerer Forschungen über Milchserum.

Zweite Mitteilung.

Von

Fr. Landolf.

(Aus dem Zentrallaboratorium des Hospitales der Nationalklinik von Buenos Aires und dem Universitätslaboratorium zu La Plata bei Buenos Aires.)

(Eingegangen am 1. Mai 1908.)

Eine zweite Arbeit über Kuhmilchserum nach meiner Methode wurde vorzugsweise unternommen, um sich über einen eigentümlichen Fall von Gärung zu vergewissern, und ferner, um auch von den ersten fraktionierten Fällungen Osazone zu erhalten, was in meiner ersten Arbeit[1]) nicht versucht worden war.

Da diese zweite Arbeit im wesentlichen dieselben Resultate wie die erste Arbeit über den gleichen Gegenstand geliefert hat, aber etwas vollständiger und ein wenig abgeändert ist — die Untersuchung erstreckt sich nicht bloß auf einen Liter, sondern auf drei Liter Milchserum —, so gebe ich hier bloß einen kurzen Auszug der erhaltenen Resultate aus den umfangreichen Protokollen.

Schon für die zweite Fraktion der 3. Hauptfällung meiner frühren Arbeit erhielten wir für einen Trockenrückstand der nicht hydrolysierten Lösung von 7,26 g aus einem Liter eine Kohlensäuremenge, die 6,80 g gärungsfähigem Zucker entspricht. Somit vergor hier der gesamte organische Rückstand.

Nun habe ich bei der 3. Fraktion der III. Hauptfällung s. Z. für die nicht hydrolysierte Flüssigkeit mit einem Trockenrückstande von 2,40 g pro mille, für die Menge gärungsfähigen Zucker die Zahl 2,00 g pro tausend angegeben. In Wirklichkeit

[1]) Diese Zeitschr. 4, 172, 1907.

aber führt die Analyse zu dem Wert 4,00 g pro tausend. Somit entspricht die Menge erhaltener Kohlensäure der doppelten Menge des Trockenrückstandes. Da mir dies höchst unwahrscheinlich schien, so habe ich den Grund dieses eigentümlichen Resultates zunächst einer beliebigen unbekannten Ursache zugeschrieben und ging darüber weg.

Aber zu derselben Zeit gab mir auch die 1. Fraktion der IV. Hauptfällung ein ähnliches Resultat, nämlich für einen Trockenrückstand von 2,13 g in 1000 eine Quantität gärungsfähigen Zucker von 3,80 g pro 1000, also somit fast das Doppelte des Trockenrückstandes der nicht hydrolysierten Lösung. Auch hier und aus dem gleichen Grunde habe ich bloß die Hälfte der wirklichen Ziffer, nämlich 1,90 g $^0/_{00}$, angegeben.

Heute, da ähnliche Befunde auch in dieser neuen Arbeit erhoben worden sind, habe ich natürlich keinen Grund mehr, an der Richtigkeit dieser Resultate zu zweifeln; ich bin davon überzeugt, daß es Kohlehydrate gibt, die mit Bierhefe und unter Umständen auch vielleicht spontan direkt in Kohlensäure und Wasser, und wenn sie stickstoffhaltig sind, in Kohlensäure, Wasser und Stickstoffverbindungen zerfallen.

Hier habe ich für die drei Fraktionen der IV. Hauptfällung, für einen Trockenrückstand der nicht hydrolysierten Lösung von 2,48 g in 1000, eine Menge gärungsfähigen Zucker von 3,20 g in 1000, und nach der Hydrolyse für einen Trockenrückstand von 1,68 g pro 1000 eine Menge Zucker gleich 4,00 g pro 1000, somit das Doppelte des Trockenrückstandes ausmachend, gefunden.

Welches kann nun die Konstitution eines Kohlehydrates sein, das 6 Kohlenstoffatome im Molekül enthält und bei der Gärung, ohne Sauerstoff zu absorbieren, also durch einfache Spaltung, wie dies beim Traubenzucker der Fall ist, nicht Kohlensäure und Alkohol, sondern bloß Kohlensäure und Wasser liefert?

Man könnte u. a. vielleicht an ringförmige Gebilde denken, die ev. zu den Substanzen der Inositgruppe in Beziehung stehen.

Was die Osazone anbelangt, so haben wir schon für die ersten Fällungen gut ausgebildete Formen erhalten. Ob sie mit den gewöhnlichen Vertretern dieser Gruppe identisch sind, ist noch unentschieden.

Wir sehen ferner, daß die verschiedenen Fraktionen von Lactose oder vielmehr von Lactosekomplexen oder Lactosepaarlingen sich sehr ungleich verhalten. Alle diese Fraktionen enthalten Stickstoff, mit Ausnahme der 8. aus der II. Hauptfällung. Hier ist nun auch der Säuregrad, mit Phenolphtalein als Indikator bestimmt, gleich Null. Somit ist die saure Reaktion sämtlicher Fällungen durch die Gegenwart von stickstoffhaltigen Substanzen bedingt und diesen proportional.

Für die 8. Fraktion der II. Hauptfällung hätte man in Anbetracht ihrer großen Reinheit und Krystallisierbarkeit glauben sollen, daß wir es mit einem gut charakterisierten Individuum zu tun haben, aber dem ist doch nicht so. Somit ist auch die reinste dieser Fällungen ein Gemenge von mindestens zwei Substanzen, von denen die eine sowohl von salpetersaurem Quecksilber als auch von essigsaurem Blei gefällt wird, während die andere dabei unangegriffen bleibt. Aber beide sind optisch aktiv, reduzieren und gären in angenähert gleichen Proportionen, und die so erhaltenen Zahlen stimmen ziemlich genau mit der organischen Substanz des erhaltenen Trockenrückstandes bei 95° überein. Hier werden sogar diese drei Eigenschaften noch bedeutend durch die Hydrolyse gesteigert.

Ich bin jetzt davon überzeugt, daß die Lactose nicht in drei oder vier verschiedenen Modifikationen, den sog. α-, β-, γ- und δ-Formen existiert, wie dies einige Autoren annehmen, sondern daß vielmehr die Lactose aus verketteten oder verschiedenen aneinandergelagerten Kohlehydraten besteht, welche verhältnismäßig leicht durch fraktionierte Fällungen und darauffolgende fraktionierte Krystallisationen getrennt werden können; das ergibt sich aus den Osazonen, aus der Polarisation, aus der Reduktion und aus der Gärung.

Es ist nun freilich zuzugeben, daß alle diese Körper, oder besser gesagt, diese Gemenge von Körpern noch mehr oder weniger stickstoffhaltig sind und daß hierdurch ihr Studium sehr erschwert wird. Diesem Übelstande kann nun abgeholfen werden, wenn man, wie ich es beabsichtige, mit größeren Quantitäten arbeitet und die erhaltenen Fraktionen der verschiedenen Fällungen der fraktionierten Krystallisation unterwirft.

Ich hatte bereits eine ziemliche Menge sehr schön krystalli-

sierter und höchst wahrscheinlich reiner Individuen in der Hand, allein ich konnte dieselben nicht abtrennen, ohne die Resultate der Analyse zu beeinträchtigen. Somit ist nun die Hauptaufgabe, reine Substanzen zu isolieren, diese zu analysieren und ihre chemischen Eigenschaften festzustellen. Dies ist freilich offenbar eine lange und mühevolle Arbeit, die jedoch allein Klarheit verschaffen kann.

Ich will noch hinzufügen, daß die Wirkung einiger Milchfermente manchmal sich durch Bildung sehr schöner, aber häufig leicht löslicher Osazone charakterisieren läßt, welche von den gewöhnlichen Kohlehydratosazonen verschieden zu sein scheinen.

Daß meine Voraussetzungen zutreffen, geht auch aus der Tatsache hervor, daß ich bei der Stickstoffbestimmung aus 1000 g chemisch reiner Glucose von Merck 0,094 g N erhalten habe.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Dekane der medizinischen Fakultät von Buenos Aires, Herrn Nationalrat Professor Dr. Eliseo Canton, meinen aufrichtigen Dank für die mir bewiesene Unterstützung bei der Fortsetzung meiner Arbeiten auszusprechen.

Über die Unterdrückung der Fuselölbildung und die Mitwirkung von Bakterien an der Bildung höherer Alkohole bei der Gärung.

Von

Hans Pringsheim.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin).

(Eingegangen am 25. Mai 1908.)

I. Die Unterdrückung der Fuselölbildung.

Das Leucin, welches bei der alkoholischen Gärung in Amylalkohol umgewandelt wird, läßt sich durch die Gegenwart anderer Stickstoffquellen, wie Asparagin, Pepton und schwefelsaures Ammoniak, die nicht in höhere Alkohole überführbar sind, teilweise vor dem Angriff der Hefe schützen.[1]) Auch in natürlichen Maischen wurde durch Zusatz von schwefelsaurem Ammoniak vor Einsaat der Hefe eine bedeutende Unterdrückung der Fuselölbildung erzielt.[2])

Die bisher im Laboratorium in Gärflaschen ausgeführte Untersuchung, bei der der Fuselölgehalt des gebildeten Alkohols nach der Methode von E. Beckmann[3]) bestimmt worden war, wurde jetzt durch eine Reihe von Versuchen in der Weender Brennerei ergänzt, die im praktischen Betriebe auf das deutlichste die Laboratoriumsergebnisse bestätigten.

In der Weender Brennerei werden 175 Pfund Roggen und 75 Pfund Mais mit 80 Pfund Gerstenmalz verzuckert und in 2000 l fassenden Bottichen zur Gärung angestellt. Der Alkohol

[1]) H. Pringsheim, Diese Zeitschr. **8**, 252, 1907. F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. **40**, 1027, 1907.

[2]) H. Pringsheim, Diese Zeitschr. **8**, 276, 1907.

[3]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **2**, 709, 1899; **4**, 1059, 1901; **10**, 143, 1905.

wird dann zuerst abdestilliert, und nachdem er durch den Zählapparat gegangen ist, in einem Sammelgefäß aufgefangen, von dem aus die aus fünf Bottichen stammenden Alkoholmengen von etwa je 84 l in den Collonenapparat gelangen. Das gereinigte Produkt wird als Trinkkorn verwandt, und die Hefe, zur Versorgung der Stadt Göttingen, mit Preßhefe abgenommen. Das Fuselöl fließt bei der Rektifikation in einen getrennten Behälter, aus dem es sich bequem abziehen und messen läßt.

Zum Zwecke der Prüfung, ob der Fuselölgehalt des Alkohols durch den Zusatz von schwefelsaurem Ammoniak herabgesetzt werden kann, wurde nun in mehreren Versuchsreihen vor Einsaat des Hefegutes, aber nach der Milchsäuerung, schwefelsaures Ammoniak zur Maische derart zugegeben, daß immer fünf Bottiche, deren Alkohol nachher gemeinsam rektifiziert werden sollte, die gleiche Menge des Salzzusatzes erhielten. Pro Bottich von 2000 l gab ich in mehreren Versuchsreihen 500 g Ammonsulfat, in einer 250 g und in einer anderen 1000 g des Salzes zu. Der Erfolg war, daß, während bei der Destillation des Alkohols ohne Zusatz aus fünf Bottichen 5 l nicht entwässertes Fuselöl gewonnen wurden, bei Zugabe von 500 und 1000 g nur 2 l abflossen, wohingegen bei 250 g Salzzugabe 2,5 l Fuselöl gebildet worden waren. 500 g Ammonsulfat hatten also für 2000 l Maische genügt, um die Fuselölbildung auf ihr Minimum zurückzudrängen, während bei 250 g Zusatz noch keine so große Schützung der Fuselöl gebenden Aminosäuren, wie sie in der speziellen Maische vorhanden waren, erzielt worden war.

Die Annahme, daß sich durch Zusatz assimilierbaren Stickstoffs die Fuselölbildung bei der Vergärung von natürlichen Maischen herabdrücken läßt[1]), wurde daher durch den Versuch in der Praxis bestätigt. Die Hefe deckt ihre Stickstoffnahrung unter solchen Bedingungen zum Teil auf Kosten des Ammoniaks. Andererseits wurde aber von neuem gefunden, daß auch die Fuselöl gebenden Aminosäuren nicht unangegriffen bleiben, da durch die Zugabe von 1000 g Ammonsulfat keine stärkere Unterdrückung der Fuselölbildung als durch Zusatz von 500 g zu erreichen war. Der von mir aufgestellte Satz[2]), keine Gärung

[1]) H. Pringsheim, l. c. 275.
[2]) l. c. 285.

ohne gleichzeitige Bildung von Fuselöl, hat auch hier seine Gültigkeit bewiesen, ja er dürfte sich nach meinen neueren Untersuchungen auch auf die alkoholische Gärung durch andere Pilze als Hefe übertragen lassen, da auch Mucor racemosus, Rhizopus tonkiniensis, Monilia candida und Torula V. die Fähigkeit, Leucin in Amylalkohol umzuwandeln, zukommt.[1])

In meinem Laboratoriumsversuch war durch die Zugabe von schwefelsaurem Ammoniak zur Weender Maische eine bedeutende Steigerung der Alkoholbildung erreicht worden, eine Steigerung, die allerdings die im praktischen Betriebe herrschenden Möglichkeiten übertraf, da hier nur eine geringe Menge unvergorener Kohlenhydrate zurückbleiben. Möglicherweise mag die niedere Anstelltemperatur von 15° schuld an diesem Ausfall gehabt haben, da bei der geringen Masse des Gärmaterials keine Erwärmung eintrat. Ich nahm an, daß durch die Anwesenheit verschieden gearteter Stickstoffquellen der Hefe, die, wie ich gezeigt habe[2]), eine weit schnellere Zuckervergärung als einfach zusammengesetzte Stickstoffquellen zur Folge haben, innerhalb der für die Vergärung erlaubten Zeit, eine bessere Ausnutzung der vorhandenen Kohlenhydrate erfolgt war. Bei Beobachtungen, die in der Weender Brennerei bei Zusatz von schwefelsaurem Ammon gemacht wurden, ließ sich nun in der Tat zeitweise ein Heraufgehen der Alkoholausbeute über den vorherigen Durchschnitt konstatieren, der etwa 3% der gewonnenen Alkoholmenge ausmachte. Mit Sicherheit konnte ein derartiger Erfolg allerdings nicht erzielt werden. Als infolge der Verwendung von neuem und besserem Malz eine Steigerung der Alkoholausbeute einsetzte, die weit die durch Ammonsulfatzugabe erreichbare übertraf, weil das Malz stärkehaltiger war, blieb der Salzzusatz ganz erfolglos. Versuche, die in einer schlesischen Kartoffelbrennerei ausgeführt wurden, gaben kein positives Resultat. Es wurde mit schwefelsaurem Ammon nicht mehr und nicht weniger Alkohol gebildet, als ohne dieses. Der hohe Eiweißgehalt der Kartoffel sicherte der Hefe offenbar bald eine genügende Stickstoffernährung. Dagegen kann ein Zusatz dieser billigen Stickstoffquelle bei der Verwendung eiweißärmerer

---

[1]) Diese Zeitschr. 8, 128, 1908.
[2]) Diese Zeitschr. l. c. 3. 188.

Materialien, wie z. B. des Mais, sehr wohl zur Bildung größerer Mengen von Alkohol innerhalb der kurzen Gärfrist führen.

II. Die Mitwirkung von Bakterien an der Bildung höherer Alkohole bei der Gärung.

Bei normaler Gärung besteht das Fuselöl neben Amylalkohol immer aus normalem Propylalkohol und Isobutylalkohol.[1]) Schon vor dem neueren Aufschwung, den die Erforschung der Fuselölbildung genommen hat, konnte ich auf die Tatsache hinweisen, daß diese Alkohole aus gleichartigen Zwischenprodukten hervorgehen müssen.[2]) Das wechselnde Verhältnis dieser Alkohole muß sich zum Teil durch die Anwesenheit wechselnder Mengen von Eiweißspaltungsprodukten der verschiedenen Gärmaterialien, wie des Getreide, Mais, Melasse, Kartoffeln, Kirschen, Pflaumen und Eicheln erklären lassen, während ein Teil des Fuselöls sicher aus den Zerfallsprodukten des Hefeeiweiß gebildet wird, die nach meinen Versuchen auch bei gut ernährter lebender Hefe in die Nährlösung übertreten.[3])

Es schien nun von Interesse zu prüfen, ob etwa die Aminosäuren, welche die im Fuselöl vorhandenen Alkohole geben, durch das schwefelsaure Ammon in verschiedenem Grade geschützt werden. Um dies zu ermitteln, wurde Fuselöl, das mit und ohne Zusatz von schwefelsaurem Ammoniak in der Weender Brennerei erhalten worden war, in die verschiedenen Alkohole getrennt. Zu meinem Staunen zeigte sich nun, daß in dem geprüften Fuselöl neben den zu erwartenden Alkoholen auch in reichlicher Menge normaler Butylalkohol vorgefunden wurde. Besonders interessant war nun, daß das Fuselöl, welches ohne Zusatz von Ammonsulfat gewonnen wurde, eine bedeutende Quantität von Isopropylalkohol enthielt, während dieses Produkt in dem mit Zusatz gewonnenen Fuselöl nur in geringen Spuren vorhanden war. Die Trennung der verschiedenen Alkohole wurde außerordentlich erschwert, da statt drei zu erwartender fünf mit zum Teil nahe beieinander liegendem Siedepunkt separiert werden mußten. Deshalb

[1]) Vgl. hierzu K. Windisch, Arb. aus dem Kais. Gesundheitsamt 8, 140, 1893.

[2]) Centralbl. f. Bakt, (Abt. II) 15, 314, 1905.

[3]) Diese Zeitschr. 3, 199, 1907.

kann sie trotz sehr wiederholter Fraktionierungen keinen Anspruch auf Genauigkeit machen. Immerhin geht aus dem Resultat hervor, daß die Fuselöl gebenden Aminosäuren ziemlich gleichartig durch schwefelsaures Ammoniak gedeckt werden.

Bei der Fraktionierung des Fuselöls, welches ohne Zusatz von Ammonsulfat erhalten wurde, isolierte ich einmal auf 378 g Amylalkohol 44,5 g normalen Butylalkohol und 35,1 g Isopropylalkohol, ein anderes Mal auf 402 g Amylalkohol 49 g normalen Butylalkohol und 20 g Isopropylalkohol. Auf 274 g Amylalkohol des mit Zusatz gewonnenen Fuselöls fand ich 22,4 g normalen Butylalkohol und auf 41,5 g Amylalkohol 5,6 g normalen Butylalkohol, während bei beiden Fällen nur geringe Mengen von Isopropylalkohol erhalten wurden.

Die Drehung des ohne Zusatz gewonnenen Amylalkohols war im 2 d Rohr $[\alpha]_D = -1{,}66^0$, in guter Übereinstimmung mit den Angaben von Markwald[1]), der für Getreidefuselöl bei verschiedenen Proben eine Drehung von $[\alpha]_D$ ($l = 2$) zwischen $-1{,}65^0$ und $-2{,}0^0$ erhalten hatte. Der mit Zusatz gebildete Amylalkohol drehte $-2{,}25^0$. Das Isoleucin scheint also in Gegenwart von schwefelsaurem Ammoniak durch die Hefe stärker angegriffen zu werden als das Leucin.[2])

Schon Claudin und Morin[3]) fanden in einem Kognak normalen Butylalkohol. Da gleichzeitig Buttersäure gebildet worden war, schlossen sie auf die Mitwirkung des Bacillus butylicus. Als dann Emmerling[4]) aus 10 kg Kornfuselöl 25 g normalen Butylalkohol absonderte, glaubte ich[5]) auch die Bildung dieses Alkohols auf Bakterienmitwirkung zurückführen zu müssen. Im vorliegenden Falle, in dem die Menge des normalen Butylalkohols im Vergleich zu den normalerweise im Fuselöl vorhandenen höheren Alkoholen eine viel größere war als in den vorgenannten Beispielen, scheint mir die Bakterienmitwirkung erwiesen zu sein, erwiesen vor allem durch die gleichzeitige Bildung des

---

[1]) Ber. d. Deutch. chem. Ges. **35**, 1597, 1902.

[2]) Vgl. hierzu F. Ehrlich, Zeitschr. d. Vereins d. Deutsch. Zuckerindustrie **55** 592, 1905.

[3]) Bull. de la Soc. chim. de Paris **49** 178, 1888.

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. **35** 694, 1902.

[5]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **15**, 302, 1905.

Isopropylalkohols. Denn normaler Butylalkohol und Isopropylalkohol, die beide im Fuselöl bei richtig geleiteter Gärung nicht vorkommen, sind, wie ich gezeigt habe[1]), die Gärprodukte des gewöhnlichen Buttersäurebacillus, der nach anderen Untersuchungen von mir[2]) weit verbreitet ist.

Die Tatsache, daß ich neben normalem Butylalkohol auch Isopropylalkohol auffand, kann keine zufällige gewesen sein. Beide Alkohole sind durch Bakterienwirkung entstanden. Das von mir untersuchte Fuselöl verdankt also seinen Ursprung zwei verschiedenen Vorgängen, erstens der Wirkung der Hefe auf die Eiweißspaltungsprodukte ihres eigenen und des in den Gärmaterialien enthaltenen Eiweiß, wodurch normaler Propyl-, Isobutyl- und Amylalkohol entstanden sind, und zweitens der Wirkung des Buttersäurebakteriums auf das Gärmaterial, der Isopropyl- und normaler Butylalkohol ihren Ursprung verdanken müssen. Fuselöl kann also durch die Wirkung der Hefe und durch die von Bakterien entstehen. Durch die Hefe kommt immer Fuselöl in den Gärungsalkohol, durch Bakterien werden höhere Alkohole bei der Hefegärung nur in seltenen Fällen gebildet. Denn ich bin keineswegs der Ansicht, daß die von mir am Weender Fuselöl gemachte Beobachtung an den Fuselölen verschiedener Brennereien eine häufige Bestätigung finden wird. Es handelt sich hier um einen extremen Fall, in dem die Leistung der Buttersäurebakterien in der Bildung höherer Alkohole eine ganz außerordentliche gewesen ist.

Es könnte hier der Einwand erhoben werden, daß ich die Buttersäurebakterien, welche für die Bildung der genannten Alkohole verantwortlich waren, nicht in der Maische aufgefunden habe. Ein solcher Versuch wäre jedoch von geringem Wert. Durch Prüfung der ursprünglichen Maische wäre es mir kaum gelungen, solche Bakterien zu identifizieren, durch Elektivkultur hätte ich mit Sicherheit aus der Maische, wie ja aus allen zur Gärung angestellten Maischen, eine Buttersäuregärung herauszüchten können.

Weiterhin könnte man einwenden, daß die Bildung von Bakterienfuselöl, wie ich den Isopropyl- und normalen Butylalkohol in diesem Falle nennen will, bei gleichzeitiger Hefegärung durch den Versuch bei

[1]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **15**, 317, 1907.

[2]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **16**, 795, 1906 und **20**, 248,. 1908.

gemeinsamer Wirkung zweier Reinkulturen zu erweisen war. Ein derartiger Versuch war jedoch schon früher[1]) erfolglos geblieben. Die Bildung höherer Alkohole durch Bakterien muß in der Maische zu einer Zeit erfolgt sein, als die Hefe entweder noch nicht ausgesät oder noch zu keiner genügenden Entfaltung gekommen war. Wir müssen also unsere Theorie, daß höhere Alkohole bei der Hefegärung durch Bakteriengärung entstehen können, fürs erste auf Grund der gleichzeitigen Auffindung von Isopropyl- und normalem Butylalkohol aufbauen.

III. Experimenteller Teil.

Die Abscheidung des Wassers, welche der Trennung der Alkohole des Fuselöls vorauszugehen hat, war im gegebenen Falle nicht die geringste Schwierigkeit. Wasser war im Fuselöl bis zu 50% enthalten. Hier muß auch darauf hingewiesen werden, daß in den Fällen, in denen Isopropylalkohol nur in geringer Menge aufgefunden werden konnte, ein Teil dadurch verloren gegangen sein kann, daß das Fuselöl im Fuselölbehälter des Rektifikationsapparates über Wasser stand. Gerade die niedriger siedenden Anteile sind im Wasser leichter löslich, so daß sich ein Gleichgewicht zwischen der Löslichkeit des Isopropylalkohols in den höheren Alkoholen und im Wasser hergestellt haben muß.

Die Wasserabscheidung aus dem Fuselöl geschah zuerst mit Hilfe von gebranntem Kalk und nachher am besten mit entwässerter Pottasche. Zur Fraktionierung bediente ich mich eines dreikugeligen Aufsatzes, der zur besseren Wirkung mit drei Platindrahtnetzen beschickt worden war. Das Normalthermometer wurde vom Dampf umspült. Die Destillation war eine sehr häufige; sie wurde so geleitet, daß nicht nur verschiedene Fraktionen genommen, sondern die einzelnen Fraktionen aufs neue fraktioniert wurden.

Zur Identifizierung der Alkohole, die im gegebenen Falle von besonderem Interesse waren, dem Isopropyl- und normalen Butylalkohol wurden bei den entsprechenden Temperaturen von 83° und 116° konstant siedende Anteile entnommen, und diese durch Jod und Phosphor in die Jodide umgewandelt, die dann bei 89° und 129° siedeten. Gerade die Siedepunkte dieser sind von den der in mögliche Frage kommenden Jodide wie Äthyljodid bei 72° normalem Propyljodid bei 102° und Isobutyl-

[1]) Centralbl. f. Bakt. (Abt. II) **15**, 319, 1905.

jodid bei 120° zur genauen Charakterisierung des Isopropyl- und normalen Butylalkohols genügend weit entfernt. Daß wirkliche Alkohole vorlagen, wurde durch die Jodbestimmung der Jodide bewiesen, die folgende Werte ergaben:

0,1393 g Isopropyljodid gaben nach der Methode von Carius 0,1932 g AgJ.

Berechnet für C_3H_7J	Gefunden
74,71 % J.	74,97 % J.

0,1521 g Butyljodid gaben nach der Methode von Carius 0,1950 g AgJ.

Berechnet für C_4H_9J	Gefunden
69,0 % J.	69,30 % J.

Zum Schluß sei noch darauf hingewiesen, daß die untersuchten Proben zu verschiedenen Zeiten aus der Weender Brauerei entnommen wurden. Die dritte Probe wurde mir drei Monate nach der ersten und zweiten, die vierte nach weiteren vier Monaten gesandt. Es ist deshalb anzunehmen, daß in dieser Brennerei Bakterienfuselölbildung ein konstantes Ereignis ist.

Zur Frage über den autolytischen und hydrolytischen Abbau des Eiweißes unter normalen und pathologischen Bedingungen.

Von

W. Glikin und A. Loewy.

(Aus dem tierphysiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 22. Mai 1908.)

Ausgehend von den in letzter Zeit vielfach gemachten Beobachtungen über Änderungen des Eiweißstoffwechsels unter pathologischen Bedingungen drängte sich uns die Frage auf, ob es nicht unter manchen Verhältnissen, speziell bei Vergiftungen, zu Änderungen des Körpereiweißes kommen könne, die chemisch nachweisbar sind.

Zur Entscheidung dieser Frage schien es uns am naheliegendsten, zunächst das Verhalten der Leber und der Muskeln gegenüber dem autolytischen Fermente, ferner die Art ihrer Aufspaltung bei der Hydrolyse zu untersuchen, und zwar vergleichsweise zunächst an den Organen gesunder Tiere, sodann an den von Tieren, die an Salzsäurevergiftung und Blausäurevergiftung zugrunde gegangen waren.

Wir benutzten zu unseren Versuchen ausschließlich Hunde, bei denen wir die Salzsäurevergiftung durch intravenöse Infusion 1 %iger Salzsäurelösung, die bis zum Eintritt des Todes fortgesetzt wurde, bewerkstelligten. Die Injektion dauerte $^1/_2$ bis 1 Stunde. Zur Blausäurevergiftung benutzten wir subcutane Injektionen einer Cyankaliumlösung, deren Konzentration so gewählt war, daß erst durch täglich mehrfach wiederholte Injektionen, deren jede zu vielstündigen schweren Vergiftungserscheinungen führte, nach 2—4 Tagen der Tod eintrat.

Wenn wir quantitativ etwaige Abweichungen verfolgen wollten, so waren wir auf die Hausmannsche Methode angewiesen, die allerdings nur einen groben Einblick in die Ver-

teilung des Stickstoffs auf die verschiedenen Komponenten des Eiweißmoleküls gewährt, aber immerhin gröbere Veränderungen anzeigen müßte.

Wir verfuhren so, daß wir unmittelbar nach dem Tode der Tiere Leber und Muskeln entnahmen, unter aseptischen Kautelen zerkleinerten, gewogene Mengen (20 g) mit der 10fachen Menge 1 %igen Toluolwassers in sterilen Gläsern 10 Tage lang bei 37° bis 41° der Autolyse überließen. Die Temperaturschwankungen zwischen 37° und 41° erwiesen sich als bedeutungslos für den Ablauf der Autolyse. Besondere Versuche zeigten auch, daß eine Ausdehnung der Autolyse bis auf 20 Tage keine weitere Veränderung in der Stickstoffverteilung bewirkte.

Ein zweiter Teil des Materials wurde im Vakuumexsiccator bei Zimmertemperatur getrocknet, in den meisten Fällen entfettet und der entfettete Rückstand der Hydrolyse unterworfen. Wir benutzten dazu pro 1 g Trockensubstanz 20 ccm rauchender Salzsäure (1,19), wobei wir die Substanz zunächst einige Stunden mit der Salzsäure stehen ließen und sie sodann 6 Stunden bei gelinder Flamme auf dem Sandbad erhitzten. Ebenso behandelten wir das bei der Autolyse nicht gelöste Material.

Zur Bestimmung der verschiedenen Stickstofffraktionen verfuhren wir so, daß wir den Amid N durch Destillation mit N-freier Magnesia gewannen; den N der Diaminosäuren bestimmten wir, indem wir den Destillationsrückstand in Salzsäure lösten, auf ein geringes Volumen eindampften und mit Phosphorwolframsäure fällten, wobei wir pro 1 g Substanz ca. 5 g Phosphorwolframsäure in konzentrierter Lösung benutzten. Der Niederschlag wurde mit einer verdünnten, salzsäurehaltigen Phosphorwolframsäurelösung gewaschen, im Trockenschrank bei 100° getrocknet und mit Schwefelsäure unter Quecksilberzusatz aufgeschlossen. Die Monoaminosäuren haben wir teils im Filtrat von den Diaminosäuren bestimmt, teils aus der Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff und der Summe des Amid- und Diaminosäurenstickstoffs berechnet.

Wir verfügen über je drei Versuche an gesunden, mit Salzsäure und mit Blausäure vergifteten Tieren; dazu kommt ein Versuch mit den Organen eines im Coma diabeticum gestorbenen jungen Menschen. Sie sind auf der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Organ	Versuchsbedingungen	Gesamt-Stickstoff %	Gelöst N in % des gesamten N	Autolyse: Amid N in % des gelösten Stickstoffs	Autolyse: Diamino N in % des gelösten Stickstoffs	Autolyse: Monoamino N in % des gelösten Stickstoffs	Autolyse: Amid N in % des gesamten Stickstoffs	Autolyse: Diamino N in % des gesamten Stickstoffs	Autolyse: Monoamino N in % des gesamten Stickstoffs	Hydrolyse: Amid N in % des gesamten Stickstoffs	Hydrolyse: Diamino N in % des gesamten Stickstoffs	Hydrolyse: Monoamino N in % des gesamten Stickstoffs	Hydrolyse des autolyt. Rückstands: Amid N in % des Gesamt-Stickstoffs	Hydrolyse des autolyt. Rückstands: Diamino N in % des Gesamt-Stickstoffs	Hydrolyse des autolyt. Rückstands: Monoamino N in % des Gesamt-Stickstoffs
Leber[1]	1. Normal	12.81	76.00	10.41	23.10	66.49	7.91	17.56	50.54	7.48	33.95	58.57	5.62	18.40	75.98
	9. „			7.89	34.40	57.71	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ [1]	10. „	11.06	74.68	9.80	36.66	53.40	7.32	27.38	39.88	5.77	13.29	80.94	6.65	40.73	52.62
„ [2]										6.37	22.07	71.56			
„ [1]	2. Vergiftung mit Salzsäure	12.95	66.60	10.14	36.34	53.52	6.70	23.46	35.64	7.48	27.40	65.12	6.20	25.91	67.89
„ [1]	5. „ (langsam)	10.74	36.70	9.45	44.10	46.45	3.46	—	17.06	9.90	55.00	35.10	Verloren		
„ [1]	8. Salzsäurevergiftung	12.69	77.54	10.73	24.84	64.43	8.13	19.26	49.95	8.48	41.41	50.11	7.34	77.85	14.81
„ [1]	4. Coma diabeticum	12.99	68.80	6.25	20.90	72.85	4.30	14.38	50.08	6.00	56.80	37.20	(zwei Bestimmungen) Verloren		
„ [3]	3. Vergiftung mit Blausäure	12.39	55.90	7.88	51.15	40.97	4.40	28.60	22.90	10.00	22.50	67.50	4.50	18.00	77.48
„ [1]	6. Schnelle Vergiftung mit Blausäure	11.85	72.60	10.00	29.30	66.70	7.26	21.27	48.40	8.22	32.80	58.80	4.20	7.80	87.00
„ [1]	7. Vergiftung mäßig schnell	12.78	74.57	10.87	25.75	63.38	8.10	18.77	47.38	8.57	42.49	48.94	14.55	37.63	47.82
Muskel[1]	1. Normal	13.33	43.20	11.65	22.88	65.47	5.03	9.99	47.22	7.42	28.83	63.75	6.20	30.63	63.17
	9. „			14.42	27.78	63.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ [1]	10. „	11.36	42.15 (auf frische Substanz bezogen)	8.17	(76.47?)	(15.82?)	3.44	(32.23?)	(64.33?)	7.92	31.68	60.40	6.67	41.68	51.65
„ [2]										6.47	19.69	74.83	4.25	Verloren	
„ [1]	2. Vergiftung mit Salzsäure	14.82	30.60	12.33	**0.00!**	87.67	3.69	0.00	26.82	6.68	10.22	83.30	6.54	33.69	59.77
„ [1]	5. „ (langsam)	14.71	21.50	7.03	64.00	28.70	1.51	13.76	6.17	8.80	41.30	49.90	6.80	33.30	59.90
„ [1]	8. Salzsäurevergiftung	13.32	32.77	16.13	29.44	54.43	5.29	9.65	17.83	6.77	17.13	76.10	6.57	22.73	71.70
„ [1]	4. Coma diabeticum	13.08	42.94	5.93	36.44	57.63	2.55	15.65	24.75	7.60	53.90	48.50	Verloren		
„ [3]	3. Vergiftung mit Blausäure	12.72	27.00	7.31	42.53	50.16	1.97	11.49	13.54	8.90	27.90	63.20	4.25	Verloren	
„ [1]	6. Schnelle Vergiftung mit Blausäure	12.61	28.40	7.50	50.30	42.20	2.13	14.29	11.98	8.81	32.40	59.50	14.00	53.90	32.10
„ [1]	7. Vergiftung mäßig schnell	13.65	42.03	15.81	23.74	60.45	6.64	9.98	25.40	7.25	39.67	53.08	6.92	41.28	51.80

[1]) Hydrolyse ausgeführt in der entfetteten Trockensubstanz. — [2]) Hydrolyse ausgeführt in der frischen Substanz. — [3]) Hydrolyse ausgeführt in der nicht entfetteten Trockensubstanz.

Was die Autolyse betrifft, so zeigen die Resultate zunächst in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Autoren die viel größere Angreifbarkeit der Leber- als der Muskelsubstanz: in ersterer ist in den normalen Organen $^3/_4$ des gesamten Stickstoffs in Lösung gegangen, in letzterer weniger als die Hälfte.

Bei der Salzsäure- wie bei der Blausäurevergiftung sind die Ergebnisse nicht in allen Versuchen gleichartig: in einzelnen ist von der Lebersubstanz weniger bei der Autolyse in Lösung gegangen als normal (Versuch 5 und 3), in der Mehrzahl der Fälle jedoch wurde annähernd oder genau so viel wie von dem normalen Lebergewebe in Lösung gebracht. Deutlicher sind Differenzen am Muskelgewebe wahrzunehmen: in allen Versuchen mit Salzsäurevergiftung, in zweien von den drei Versuchen mit Blausäurevergiftung geht deutlich weniger Substanz in Lösung als normal; nur in dem Falle des Coma diabeticum, aber auch in dem einen Versuch mit Blausäurevergiftung entspricht die autolytische Wirkung vollkommen der Norm.

Der Amidstickstoff beträgt bei der Autolyse normaler Leber ca. 8 bis 10,4% des gelösten Stickstoffs, beim normalen Muskel ca. 8 bis 14,4% — die Schwankungen sind hier also größer als bei der Leber.

In den 3 Versuchen mit Salzsäurevergiftung liegen die Amidstickstoffwerte bei Autolyse der Leber vollkommen auf dem Niveau der Norm (9,5 bis 10,7% des gelösten Stickstoffs), die Amidstickstoffwerte des Muskels schwanken so erheblich, daß sie die normalen Werte nach oben wie nach unten übertreffen. Auffallend niedrig liegt der Amidstickstoff der autolysierten Leber wie des Muskels beim Coma diabeticum (6,25 bzw. 5,93% des gelösten N). — Die Amidstickstoffwerte bei der Blausäurevergiftung liegen für die Leber innerhalb der normalen Grenzen, beim Muskel finden wir in zwei Versuchen etwas unternormale Werte (Versuch 3 und 4), in einem dritten (Versuch 7) einen abnorm hohen. — Wir finden somit Abweichungen in der Menge des Amidstickstoffs gegenüber der Norm nur im autolysierten Muskel, nicht in der Leber (wenn wir für letztere vom Coma diabeticum absehen); die Abweichungen beim Muskel haben jedoch nichts Charakteristisches, da sie in der Mehrzahl der Fälle nach unten von der Norm liegen, in einigen dagegen oberhalb.

Der Diaminosäurenstickstoff, bezogen auf die Menge des in Lösung gegangenen, zeigt in den normalen Organen relativ geringe Schwankungen, in den der mit Salzsäure oder Blausäure vergifteten Tiere weit erheblichere, ohne daß auch hier etwas Gesetzmäßiges sich aussagen ließe; eben dasselbe muß von dem Verhalten der Monoaminosäuren gesagt werden.

Was die Ergebnisse der Hydrolyse der frischen Organe betrifft, so zeigt ein Überblick auf Kolumne 8, daß der Amidstickstoff unter allen Verhältnissen, bei Leber wie Muskel, nicht wesentlich von der Norm abweicht. Der Diaminosäurenstickstoff schwankt schon bei den normalen Organen nicht unbeträchtlich (zwischen 13,3 und 34% des Gesamtstickstoffs), in den Vergiftungszuständen finden wir, ebenso wie für den Diaminostickstoff in den autolysierten Organen, weit beträchtlichere Schwankungen als in der Norm, meistenteils im Sinne einer Vermehrung, nur in einzelnen Fällen am Muskel im Sinne einer Verminderung. Ähnlich große Schwankungen müssen natürlich auch die Monoaminosäuren zeigen, nur liegen sie in der umgekehrten Richtung, so daß ihre Menge in der Mehrzahl der Fälle gegenüber der Norm vermindert ist.

Endlich die Werte, die sich bei der Hydrolyse des Rückstandes der autolysierten Organe fanden. Die Amidstickstoffwerte zeigen nicht die Gleichmäßigkeit wie die bei der Hydrolyse der frischen Organe. Schon ein Wert am normalen Muskel liegt unterhalb der sonst an Leber und Muskel normaler Tiere gewonnenen. Auffallenderweise entsprechen alle bei Säurevergiftung gefundenen Werte den normalen; abweichend dagegen sind die bei Blausäurevergiftung, aber die Abweichung ist auch hier keine gleichsinnige.

Die Diaminosäuren zeigen auch hier, in Analogie zu ihrem Verhalten bei der Hydrolyse der frischen Substanz, schon an den normalen Organen stärkere Schwankungen als der Amidstickstoff. In den Vergiftungsversuchen sind die Schwankungen noch erheblicher nach oben wie nach unten, als in der Norm, ohne daß eine bestimmte Beziehung zu der Art der Vergiftung zu erkennen wäre. —

Der Standpunkt, den wir zur Beurteilung der Ergebnisse einnehmen müssen, muß verschieden sein: einerseits hinsichtlich der Stickstoffmengen, die bei der Autolyse in Lösung

gingen, und der Amidstickstoffmengen, die sich sowohl bei der Autolyse wie bei der Hydrolyse fanden, andererseits hinsichtlich der Zahlen für den Stickstoff der Diamino- und Monoaminosäuren.

Bezüglich der Werte für die Mengen des bei der Autolyse gelösten Stickstoffs wie des Amidstickstoffs können wir davon ausgehen, daß die Bestimmungsmethode eine zuverlässige ist und zu Fehlern keine Veranlassung geben kann. Demgemäß stimmen diese Werte, soweit sie an normalen Lebern und Muskeln gefunden wurden, innerhalb enger Grenzen miteinander überein. Die Abweichungen, die wir bei den vergifteten Organen fanden, dürfen wir als einen Erfolg der Vergiftung betrachten und müssen demnach sagen, daß sowohl beim salzsäure- wie beim blausäurevergifteten Muskel eine Hemmung der autolytischen Wirkung einzutreten pflegt (5 Fälle unter 7). In 2 Fällen war allerdings keine Abweichung von der Norm zu ersehen, wobei vielleicht der Fall vom Coma diabeticum, trotzdem dieses auf eine Säurevergiftung bezogen wird, eine besondere Stellung einnimmt und nicht mit der intravenösen Salzsäurevergiftung auf gleiche Stufe gestellt werden kann. Besonders bemerkenswert ist die Hemmung bei der Salzsäurevergiftung deshalb, weil bekanntlich die Autolyse bei saurer Reaktion durch Säurezusatz in vitro erheblich energischer vor sich geht als sonst.

Im Gegensatz zu der hemmenden Wirkung der Salzsäure- und Blausäurevergiftung auf die autolytische Stickstofflösung zeigt sich der Anteil, den der Amidstickstoff an der in Lösung gegangenen Stickstoffmenge hat, nicht deutlich beeinflußt. Die Grenzen, innerhalb deren er bei den Vergiftungen schwankt, sind nicht viel weiter als in der Norm. Eine Ausnahmestellung nimmt höchstens das Coma diabeticum ein, bei dem die Amidstickstoffwerte auffallend niedrig liegen.

Auch die Amidstickstoffwerte bei der Hydrolyse der frischen Organe sind bei den Vergiftungsfällen nicht wesentlich von den der normalen Organe verschieden. Selbst wenn wir die geringe Zunahme des Amidstickstoffs in Versuch 5 (Salzsäurevergiftung) und Versuch 3 (Blausäurevergiftung) als außerhalb der normalen Grenzen betrachten wollen, so bleibt es immerhin auffallend, einen wie geringen Einfluß auf

die Amidstickstofffraktion Vergiftungen ausüben, die zu den schwersten Störungen der Funktion der untersuchten Organe führen.

Weit unsicherer ist die Beurteilung der Werte für die Diamino- und Monoaminosäuren, die sich in unseren Versuchen fanden. Die Deutung der Werte ist unsicher, weil schon an den normalen Organen, speziell an der Leber, ganz beträchtliche Differenzen bei beiden Fraktionen vorhanden sind. Dabei muß natürlich der Zweifel auftauchen, ob diese Differenzen reelle sind, oder ob etwa Mängel der Methodik, insbesondere der Zuverlässigkeit der Phosphorwolframsäurefällung diese Differenzen verschulden. Es ist nicht gut anzunehmen, daß das Eiweiß desselben Organes bei verschiedenen gesunden Tieren der gleichen Art sich in so differenter Weise aufbauen sollte wie das (conf. Versuche 1, 9, 10) für die Leber in unseren Versuchen der Fall ist. Dabei ist besonders auffallend, daß die analogen Fraktionen, z. B. die Diaminosäuren, bei einem Vergleich der Hydrolyse der frischen Substanz mit der des Rückstandes von der Autolyse in den in Betracht kommenden beiden Versuchen ein ganz verschiedenes Verhalten zeigen, indem im ersten Versuche die Menge des Diaminosäurenstickstoffs in den frischen Organen einen weit höheren Anteil am Gesamt-N ausmacht als im Autolysenrückstand, während im zweiten Versuch das Verhalten gerade umgekehrt ist. Unter diesen Umständen können wir uns nicht für berechtigt halten, aus den Abweichungen, die sich bei den vergifteten Organen fanden und die, wie vorher schon erwähnt, nicht alle in gleicher Richtung liegen, bindende Schlüsse zu ziehen.

Vorläufig scheint uns eine sich der Phosphorwolframsäurefällung bedienende Methode zur Bestimmung der verschiedenen Stickstofffraktionen des Eiweißmoleküls nicht sicher genug zu sein, um Aufschlüsse über pathologische „Eiweißabartung" zu liefern. Für uns wird es sich zunächst darum handeln, an normalen Organen unsere Untersuchungen fortzusetzen und zu ermitteln, auf welche Weise man zu konstanten Ergebnissen kommen kann.

Als einziges Resultat unseres umfangreichen Zahlenmaterials können wir vorläufig nur das betrachten, daß die autolytischen Vorgänge im salzsäure- und blausäurevergifteten Muskel gegen-

über der Norm gehemmt zu sein pflegen, während in der Leber diese Hemmung meist nicht ersichtlich ist.

Die Amidstickstofffraktion hat, wenn wir vom Coma diabeticum absehen, überhaupt keine deutliche Beeinflussung durch die Vergiftung erfahren weder in der durch Hydrolyse aufgeschlossenen noch in der durch Autolyse gelösten Organsubstanz.

Autorenverzeichnis.

Abderhalden, Emil. Zur Frage des Albumosegehaltes des Gesamtblutes, des Plasmas und des Serums. S. 277.

Ascoli, M., und G. Izar. Beeinflussung der Autolyse durch anorganische Kolloide. IV. S. 356.

Battelli, F. und Lina Stern. Über das Vorkommen der Antikatalase im Tierorganismus. S. 275.

Bauer, J. Über die bei der Wassermannschen Luesreaktion wirksamen Körper und über die hämolytischen Eigenschaften der Organextrakte. S. 301.

Benfey, Arnold. Über eiweißspaltende Enzyme im Säuglingsharn. S. 458.

Berntrop, J. C. Bemerkung zur Mitteilung der Herren M. Kumagawa und K. Suto über „Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierischem Material nebst der Kritik einiger gebräuchlichen Methoden". S. 192.

Blumenthal, Ferd. und Friedrich Herschmann. Atoxyl- und Anilinvergiftung. S. 240.

Butkewitsch, W. Zur Frage über die Umwandlung der Stärke in den Pflanzen und über den Nachweis der amylolytischen Enzyme. S. 314.

Ehrenreich, M., siehe Michaelis und Ehrenreich.

Funaro, Roberto. Über die quantitative Bestimmung einiger reduzierender Substanzen im Säuglingsharn. S. 463.

— — Über den Kreatiningehalt des Säuglingsharns. S. 467.

Glikin, W. und A. Loewy. Zur Frage über den autolytischen und hydrolytischen Abbau des Eiweißes unter normalen und pathologischen Bedingungen. S. 498.

Goldenthal, Clara, siehe Traube und Goldenthal.

Herschmann, Friedrich, siehe Blumenthal und Herschmann.

Jacoby, Martin. Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente. VII. S. 229.

— — Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente. VIII. S. 232.

Jessen-Hansen, H. Einige Bemerkungen über die Bangsche Methode der Zuckerbestimmung. S. 249.

Izar, G., siehe Ascoli und Izar.

Klempin, Paul. Studien über das amylolytische Ferment im Hafer. S. 204.

Kusumoto, Chasaburo. Die Ausscheidung der Ätherschwefelsäuren im Harn nach Einführung von Salicin in den Körpern des gesunden und des pankreaslosen Hundes. S. 264.

Landolf, Fr. Ergebnisse neuerer Forschungen über Milchserum. II. S. 486.

Lebedew, Alexander. Auftreten von Formaldehyd bei der zellfreien Gärung. S. 454.

Levene, P. A. u. John A. Mandel. Über die Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren XIII. S. 215.

— — und John A. Mandel. Zur Chemie der Lebernucleoproteide. S. 221.

— — und D. D. van Slyke. Zur Methodik der Destillation der Aminosäurenester mittels der Geryk-Pumpe. S. 214.

Loewy, A., siehe Glikin u. Loewy.
Mandel, John A., siehe Levene und Mandel.
Marchlewski, L., Studien in der Chlorophyllgruppe. S. 131.
— — Studien in der Chlorophyllgruppe. II. S. 472.
— — u. J. Retinger. Zur Kenntnis des Hämopyrrols. S. 437.
Michaelis, Leonor u. M. Ehrenreich. Die Adsorptionsanalyse der Fermente. S. 283.
Nerking, Joseph. Beiträge zur Kenntnis des Knochenmarkes. S. 167.
— — Die Verteilung des Lecithins im tierischen Organismus. S. 193.
Omi, Kaoru. Über das Verhalten des Salicins im normalen und diabetischen Organismus. S. 258.
Orgler, Arnold. Bemerkungen zu den Arbeiten von Aron und Sebauer: „Untersuchungen über die Bedeutung der Kalksalze usw." und von Aron und Frese: Die „Verwertbarkeit verschiedener Formen des Nahrungskalkes usw." S. 236.
Ostwald, Wolfgang. Über die Lichtempfindlichkeit tierischer Oxydasen und über die Beziehungen dieser Eigenschaft zu den Erscheinungen des tierischen Phototropismus. S. 1.
Pringsheim, Hans. Über die Unterdrückung der Fuselölbildung und die Mitwirkung von Bakterien an der Bildung höherer Alkohole bei der Gärung. S. 490.
Retinger, L., siehe Marchlewski und Retinger.
Seligmann, E. Zur Kenntnis der Seruminaktivierung. S. 430.
Skraup, Zd. H. Über Desaminoproteine. S. 245.
van Slyke, D. D., siehe Levene und van Slyke.
Stern, Lina, siehe Battelli und Stern.
Traube, J. Über die Wirkung lipoidlöslicher Stoffe auf rote Blutkörperchen. S. 371.
— — Zur Komplementfrage. S. 380.
— — Zur Frage der Virulenz der Bakterien. S. 387.
— — Zur Spezifizitätsfrage. S. 396.
— — und Clara Goldenthal. Das rote Blutkörperchen und sein Inhalt. S. 390.
Tsurusaki, H. Zur Kenntnis der komplexen Hämolysine. S. 345.
Tswett, M. Über das Phaeophytin und die Chlorophyllane nebst Schlußbemerkungen über das Phylloxanthin. S. 404.
— — Über die Natur des sogen. „krystallisierbaren Chlorophylls" (Metachlorophyllins). S. 414.
— — Das neue System der sogenannten Chlorophyllderivate. S. 426.

PERIODICAL

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW

RENEWED BOOKS ARE SUBJECT TO
IMMEDIATE RECALL

Library, University of California, Davis
Series 458A

61861
Biochemische zeitschrift.
QP501
B54
v.10
12-10
JAN 2 1968
Biochemische zeitschrift
QP501
B54
V.10
PERIODICAL
61861